

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2017

Lucie Sedláčková



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**EXTRAKCE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK Z VÝLISKŮ
ČERNÉHO RYBÍZU**

EXTRACTION OF BIOACTIVE SUBSTANCES FROM BLACK CURRANT POMACE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lucie Sedláčková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1115/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Lucie Sedláčková**
Studijní program: Chemie a technologie
potravin Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Extrakce biologicky aktivních látek z výlisků černého rybízu

Zadání bakalářské práce:

Teoretická část:

- 1) Stručná charakteristika rostlinného druhu *Ribes nigrum*
- 2) Biologicky aktivní látky obsažené v černém rybízu, využití tohoto ovoce
- 3) Stanovení fenolických látek
- 4) Stručný popis vybraných extrakčních postupů

Experimentální část:

- 1) Příprava výlisků a šťávy z plodů černého rybízu
- 2) Příprava extraktů z výlisků černého rybízu vybranými postupy
- 3) Stanovení chemických charakteristik připravených extraktů a rybízové šťávy
- 4) Zpracování získaných dat a interpretace výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Lucie Sedláčková
student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá extrakcí biologicky aktivních látek z výlisků černého rybízu (*Ribes nigrum*).

Teoretická část obsahuje botanickou charakteristiku rostlinného druhu *Ribes nigrum*. Dále je část věnována biologicky aktivním látkám obsaženým v černém rybízu a možnostem jeho využití v potravinářství. Čtvrtá část je věnována popisu fenolických látek, jejich rozdělení a metodám stanovení fenolických látek. Pátá kapitola popisuje vybrané extrakční postupy.

V experimentální části práce byly extrahovány suché výlisky z černého rybízu za účelem optimalizovat průběh extrakce a získat co nejvyšší výtěžky barviv. Dále byly stanoveny vybrané chemické a fyzikální charakteristiky šťávy z černého rybízu a extraktů z jeho výlisků.

Lepším rozpouštědlem byla směs vody a ethanolu v objemovém poměru 1:1. Po 14 hod. maceraci suchých výlisků bylo získáno ze 100 g suchých výlisků 769,9 mg anthokyanů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Černý rybíz (*Ribes nigrum*), extrakce, anthokyanová barviva, fenolické látky, sušina, rozpustná sušina, redukující sacharidy, pH, titrační kyselost, vitamin C.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with extraction of bioactive substances from black currant pomace (*Ribes nigrum*).

The theoretical part contains the botanical characteristics of the plant species *Ribes nigrum*. It is also devoted to the biologically active substances contained in black currant and possibilities of using black currant in the food industry. The fourth chapter deals with description of phenolic compounds, their distribution and methods of determination of phenolic substances. The fifth chapter describes selected extraction procedures.

In the experimental part, there were extracted dry black currant pomace in order to optimize the extraction process and obtain the highest yields of dyes. In addition, were determined the selected chemical and physical characteristics of blackcurrant juice and extracts from blackcurrant pomace.

A better solvent was a mixture of water and ethanol in a volume ratio of 1:1. After 14 hours maceration of dry pomace, were obtained 769,9 mg anthocyanins per 100 g of dry material.

KEY WORDS

Black currant (*Ribes nigrum*), extractions, total anthocyanins, total phenolics, dry matter, soluble solids, reducing sugars, pH, titratable acids, vitamin C.

SEDLÁČKOVÁ, L. *Extrakce biologicky aktivních látek z výlisků černého rybízu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 60 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí bakalářské práce RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. za podporu, cenné rady a odborné vedení při zpracování práce. Dále bych chtěla poděkovat PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za ochotu a pomoc při práci v laboratoři.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Černý rybíz (<i>Ribes nigrum</i>)	10
2.1.1	Historie pěstování rybízu	10
2.1.2	Botanický popis černého rybízu	10
2.1.3	Nároky na stanoviště	11
2.1.4	Některé vyšlechtěné odrůdy černého rybízu	12
2.1.5	Šlechtění černého rybízu	13
2.2	Chemické složení plodů černého rybízu	13
2.3	Využití černého rybízu v potravinářství	16
2.4	Fenolické látky	17
2.4.1	Fenolické kyseliny	17
2.4.2	Flavonoidy	18
2.4.3	Stilbeny	20
2.4.4	Tanniny	20
2.4.5	Stanovení fenolických látek	20
2.5	Popis extrakčních postupů	21
2.5.1	Extrakce potravinářských materiálů	21
2.5.2	Dílčí kroky průběhu extrakce	22
2.5.3	Jednostupňová extrakce	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1	Příprava výlisků a šťávy z plodů černého rybízu	23
3.1.1	Použité pomůcky a přístroje	23
3.1.2	Původ rostlinného materiálu	23
3.1.3	Příprava výlisků a šťávy	23
3.2	Příprava extraktů z výlisků černého rybízu vybranými postupy	23
3.2.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie	23
3.2.2	Extrakce suchých rybízových výlisků	23
3.3	Stanovení sušiny sušením	24
3.3.1	Použité pomůcky a přístroje	24
3.3.2	Příprava vzorků a vlastní měření	24
3.3.3	Výpočet	24

3.4	Refraktometrické stanovení rozpustné sušiny	24
3.4.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie	24
3.4.2	Příprava vzorků a vlastní měření	25
3.4.3	Výpočet.....	25
3.5	Stanovení celkových anthokyanových barviv pH diferenciální metodou	25
3.5.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie	25
3.5.2	Příprava roztoků	26
3.5.3	Příprava vzorků a samotné měření	26
3.5.4	Výpočet.....	26
3.6	Stanovení celkových fenolických látek podle Folin-Ciocalteua	27
3.6.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie	27
3.6.2	Příprava roztoků	27
3.6.3	Příprava vzorků a samotné měření	28
3.6.4	Výpočet.....	28
3.7	Stanovení redukujících cukrů podle Bertranda a gravimetricky	28
3.7.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie	28
3.7.2	Příprava roztoků	29
3.7.3	Příprava vzorků a samotné měření	30
3.7.4	Výpočet.....	31
3.8	Stanovení pH	32
3.8.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie	32
3.8.2	Příprava vzorků a samotné měření	33
3.9	Stanovení titrovatelných kyselin	33
3.9.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie	33
3.9.2	Příprava roztoků	33
3.9.3	Příprava vzorků a samotné stanovení	34
3.10	Stanovení vitamínu C.....	34
3.10.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie	34
3.10.2	Příprava roztoků	35
3.10.3	Příprava vzorků a samotné stanovení	36
3.10.4	Výpočet.....	36
3.11	Statistické zpravování naměřených dat.....	37
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	38

4.1	Výběr rozpouštědla pro extrakci výlisků	38
4.2	Stanovení sušiny sušením	40
4.3	Refraktometrické stanovení rozpustné sušiny	41
4.4	Stanovení pH	42
4.5	Stanovení titrovatelných kyselin	42
4.6	Stanovení anthokyanových barviv ve vybraných extraktech z výlisků	43
4.7	Stanovení fenolických látek	45
4.8	Obsah redukujících cukrů	46
4.9	Stanovení vitamínu C	47
5	ZÁVĚR	49
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	55
8	SEZNAM PŘÍLOH	56
9	PŘÍLOHY	57

1 ÚVOD

Černý rybíz (*Ribes nigrum*) patří mezi drobné bobulové ovoce.

Je to vysoce hodnotné ovoce, které obsahuje mnoho rostlinných antioxidantů. Je významným zdrojem vitamínu C a mnoha dalších esenciálních nutričních látek. Černý rybíz je bohatý na fenolické látky a anthokyany. Fenolické látky patří k nejúčinnějším přírodním látkám působícím proti volným radikálům. V potravinářském průmyslu se používají jako barviva a konzervační látky. Anthokyany jsou červeně až fialově zbarvené sloučeniny patřící mezi přírodní potravinářská barviva. Jako potravinářská aditiva se označují kódem E163.

Z plodů černého rybízu je vyráběno široké spektrum potravinářských výrobků, například nealkoholické nápoje, džemy, čaje a potravinářské koncentráty. Vedlejší produkt při průmyslovém zpracování plodů rybízu jsou výlisky, které se obvykle dále nevyužívají, pouze kompostují. Tyto výlisky však obsahují stále poměrně velké množství barviv, které je ještě možné dále využít jako zdroj přírodního barviva.

Náplní této bakalářské práce bylo optimalizovat extrakci antokyanových barviv z výlisků černého rybízu. Cílem bylo zjistit v jakém čase, s použitím jakého rozpouštědla lze dosáhnout nejlepších výsledků. V extraktech, které vykazovaly nejvyšší obsah barviv, byla stanovena chemická charakteristika biologicky aktivních látek. Získané údaje byly porovnány s obsahem těchto látek ve šťávě získané při lisování plodů černého rybízu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Černý rybíz (*Ribes nigrum*)

Rostlina taxonomicky patří do čeledi meruzalkovitých (Grossulariaceae) kam patří asi 120 druhů rozšířených v mírném a chladném pásu Evropy, Asie, Severní Ameriky, severní Afriky, Jižní Ameriky [1].

Taxonomické zařazení rybízu [2]:

Říše:	Plantae	(rostliny)
Podříše:	Tracheobionta	(cévnaté rostliny)
Nadoddělení	Spermatophyta	(semenné rostliny)
Oddělení	Magnoliophyta	(krytosemenné rostliny)
Třída:	Rosopsida	(vyšší dvouděložné rostliny)
Podtřída:	Rosidae	(růžokvěté)
Řád:	Saxifragales	(lomikamenotvaré)
Čeleď:	Grossulariaceae	(meruzalkovité)
Rod:	Ribes L.	(rybíz)

2.1.1 Historie pěstování rybízu

První záznam o rybízu pochází z roku 1184 z Mohučského herbáře. Předpokládá se však, že se rybíz pěstoval mnohem dříve, než byl poprvé vyobrazen. Způsob pěstování rybízu byl popsán v knize Gaerde der Sundheit v roce 1492 a první popis rybízového keře zaznamenal v roce 1536 J. Ruellio. Počátek šlechtění rybízu je datován do 16. století. Jako zahradní ovoce byl rybíz poprvé uveden v anglické zemědělské literatuře v 16. století. V roce 1826 bylo v anglickém zahradním katalogu uvedeno již 35 odrůd rybízu [1].

O začátcích pěstování rybízu u nás nejsou zachované přesné údaje, ale je pravděpodobné, že se k nám dostal v 16. století z Německa a šířil se především do klášterních a zámeckých zahrad. V roce 1933 bylo Československo považováno za pěstitelskou velmoc rybízu. Od 50. let minulého století se v ČSSR datuje šlechtění a výzkum rybízu [1].

2.1.2 Botanický popis černého rybízu

Rybíz vytváří víceleté keře vzpřímeného vzrůstu. Keř černého rybízu má obvykle 10–15 přizemních větví různého věku. Letorosty narůstají koncem května až začátkem června. Listy jsou opadavé a letorosty jsou beztrnné, holé. Rybíz kvete přímo na jednotlivých výhonech nebo na plodovém obrostu dvouletých větví, méně již na větvích tříletých [1, 3].

Květy jsou nevýrazné, talířovitého, miskovitého nebo zvonkovitého tvaru tvořící hroznovité květenství. Barva květů je žlutozelená, načervenalá až nafialovělá. Kvetou brzy, od druhé poloviny dubna přibližně 8–20 dní. Délka kvetení je závislá na odrůdě, stanovišti, teplotních podmínkách a vláze. Všechny botanické druhy rybízu jsou

hmyzosnubné. Černý rybíz je částečně cizosprašný, opylení cizím pylem u odrůd jen částečně samosprašných zvyšuje násadu, počet semen a tím i váhu plodů. Ze včelařského hlediska je rybíz důležitou nektarodárnou a pylodárnou rostlinou [1, 3, 4].



Obrázek 1: květy černého rybízu [5]

Plody dozrávají od 20. června do poloviny srpna podle odrůdy. Plodenstvím je krátký hrozen tvořený jednotlivými bobulemi. Hrozen vyrůstá na středně dlouhých, někdy i jednotlivě kratších stopkách. Bobule jsou různě velké, kulaté, holé obsahující různý počet semen [1, 3, 6].



Obrázek 2: plody černého rybízu [7]

Kořenová soustava je středně silná, kořeny po výsadbě rostou mělce do šířky a později po celé ploše pod keřem až do hloubky 20 cm. Nadzemní dřevě rybízu u většiny odrůd snadno zakořeňuje i v případě, že se pouze dotýká půdy [3].

2.1.3 Nároky na stanoviště

Černý rybíz má vyšší nároky na půdu a klima. Poloha vhodná na pěstování by neměla být položena výše než 500 m nad mořem a optimální průměrná roční teplota by se měla

pohybovat mezi 7 až 9 °C. Černý rybíz je v době kvetení citlivý na mrazová poškození a nehodí se na větrná stanoviště. Na příliš osluněných jižních svazích může docházet k asychání listů a keře na takovýchto stanovištích příliš nerostou. Rybíz dobře roste v lehčích, výhřevných, humózních půdách s dostatkem vláhy a živin. Kořenový systém se utváří mělce pod povrchem půdy, rostliny jsou proto citlivé na nedostatek vláhy [1, 4, 8].

2.1.4 Některé vyšlechtěné odrůdy černého rybízu

Otelo je slovenská odrůda vzniklá křížením odrůdy Boskoopský černý a Silvergieter. Raná až středně raná odrůda s černými leklými velkými bobulemi. Plody jsou chutné sladkokyselé aromatické. Plodnost je vysoká a pravidelná. Odolnost vůči napadení americkým padlím angreštovým a rzi vejmutovkové je nízká až střední. Plody mají vysoký obsah vitamínu C [8].

Öjebyn je švédská odrůda jejíž šlechtitelský původ není znám. Raná až středně raná odrůda s černými lesklými většími bobulemi. Bobule jsou lahodné navinule sladké aromatické. Plodnost je střední a pravidelná. Odolnost proti americkému padlí angreštovému je vysoká, proti rzi vejmutovkové nízká. Plody mají nízký obsah vitamínu C [8].

Focus je česká odrůda vzniklá křížením Fertödi I. s genotypem ze slovenských Bojnic. Je to velmi raná až raná odrůda s černými lesklými velmi velkými bobulemi. Nestejnoměrně dozrává. Plody jsou sladké aromatické. Odolnost vůči americkému padlí angreštovému je střední [8].

Démon je česká odrůda vzniklá křížením odrůd Fertödi I. a Roodknop. Odrůda je velmi raná s černými středně velkými plody. Plody jsou chutné navinule sladké. Plodnost je vysoká a pravidelná. Odolnost proti americkému padlí angreštovému je střední až vysoká. Odrůda je odolná vůči nízkým teplotám v době kvetení [8].

Eva je slovenská odrůda vzniklá křížením odrůd Silvergieter a Holandský černý. Raná až středně raná odrůda. Plody jsou černé středně velké až velké. Bobule jsou sladkokyselé a aromatické. Plodnost je brzká, vysoká a pravidelná. Odolnost vůči americkému padlí angreštovému je nízká. Odrůda je vhodná pouze do teplých oblastí, jelikož je náchylná na poškození mrazem v době kvetení [8].



Obrázek 3: odrůda Otelo [9]

2.1.5 Šlechtění černého rybízu

Šlechtění rybízu je zaměřeno na výkonnější, vzrostlejší, vzpřímenější rostliny, které se snadno množí a jsou vhodné pro intenzivní výsadby. Je snaha vyšlechtit rostliny, které jsou odolnější vůči chorobám listů a proti sprchávání květů. U černoplodých rybízů se požadují bobule s vysokým obsahem vitamínu C a dobrými konzervařenskými hodnotami [3].

2.2 Chemické složení plodů černého rybízu

Rybíz má stejně jako ostatní druhy ovoce vysoký obsah vody a to až přes 80%. Plody nemají vysokou kalorickou hodnotu, jelikož obsah sacharidů, tuků a dusíkatých látek je nízký [1, 10].

Tabulka 1: Energetické hodnoty vybraného ovoce [11]

Ovoce	Energetická hodnota (kcal·100 g ⁻¹ jedlého podílu)	Energetická hodnota (kJ·100 g ⁻¹ jedlého podílu)
Rybíz černý	62	258
Rybíz červený	49	205
Rybíz bílý	52	218
Angrešt	44	186
Ostružiny	54	225
Jablka	52	219

Obsah cukrů v černém rybízu se pohybuje v rozmezí 2,5 až 10 %. Převážně jsou obsaženy monosacharidy glukosa a fruktosa. Na rozdíl od jiných druhů ovoce obsahuje jen malé množství disacharidů (sacharosy) [1].

Tabulka 2: Obsah sacharidů ve vybraných druzích ovoce [11]

Obsah glukosy, fruktosy a sacharosy v g·100 g ⁻¹ jedlého podílu			
Ovoce	Glukosa	Fruktosa	Sacharosa
Rybíz černý	3,2	4,0	0,3
Rybíz červený	1,9	2,6	0,4
Banány	4,1	4,3	10,6
Ostružiny	2,3	2,4	0,1
Jablka	2,5	5,8	2,5

Z polysacharidů se v rybízu vyskytují pektiny, celulóza a škrob. Jsou přítomny v nezralém ovoci a při zrání jsou enzymaticky štěpeny na jednoduché cukry. Obsah pektinových látek (propektin, pektin) a celulózy je důležitý z hlediska celkového vzhledu potravinářských výrobků z plodů černého rybízu, které jsou tvarem, barvou, vůní a celkovým charakterem lákavé pro spotřebitele. Obsah pektinových látek v černém rybízu je 1–1,4 % [1,10].

Obsah tuků a bílkovin v rybízu je malý. Průměrný obsah tuků je 0,5 až 1,7 % a obsah bílkovin 0,9 až 1,9 % [1].

Černý rybíz je pro výživu člověka velice důležitý z hlediska obsahu vitaminů. Zejména obsah vitaminu C v černém rybízu je oproti ostatním druhům rybízu vysoký, v plodech se vyskytuje z 95 % v redukované formě kyseliny L-askorbové. Obsah vitaminu C v plodech závisí na odrůdě černého rybízu a podmínkách pěstování [1,10].

Tabulka 3: Obsah vitaminu C ve vybraných druzích ovoce [11]

Ovoce	Obsah vitaminu C v mg·100 g ⁻¹ jedlého podílu
Černý rybíz	166,0
Červený rybíz	34,5
Angrešt	29,7
Ostružiny	17,9
Citróny	49,0
Jablka	9,3

Ostatní vitamíny jsou zastoupeny méně. Jejich obsah je závislý na odrůdě, zeměpisné poloze, klimatických podmínkách, půdních a agrotechnických podmínkách, stupni zralosti, roční a denní době sklizně, skladovacích podmínkách apod. [1,10].

Tabulka 4: Obsah vitaminů v černém rybízu [11]

Vitaminy	Obsah	Jednotka
vitamin A	7,00	RE*
beta-karoten	88,00	μg
vitamin B1	0,05	mg
vitamin B2	0,05	mg
vitamin E	2,10	ATE**
alfa-tokoferol	2,10	mg

*1 RE (ekvivalent retinolu) udává aktivitu odpovídající 1 μg retinolu, ** 1 ATE (ekvivalent alfa-tokoferolu) udává aktivitu odpovídající 1 mg alfa-tokoferolu

Obsah minerálních látek v černém rybízu je vyšší než u jiných druhů rybízu. [1]

Tabulka 5: Obsah minerálních látek ve vybraných druzích ovoce [11]

Obsah minerálních látek v mg·100 g ⁻¹ jedlého podílu			
Minerální látky	Černý rybíz	Červený rybíz	Angrešt
Sodík	5,0	4,0	7,0
Hořčík	19,0	12,0	14,0
Fosfor	50,0	30,0	34,0
Draslík	306,0	225,0	196,0
Vápník	45,0	28,0	31,0
Železo	1,4	1,1	0,6

Obsah organických kyselin je poměrně vysoký 1–4 %. Organické kyseliny mají bakteriostatické a bakteriocidní účinky [1].

Obsah tříslovin v černém rybízu je od 0,42 do 0,80 %. Třísloviny způsobují natrpklou chuť, při vyšším obsahu způsobují svíravou chuť. Obsah tříslovin klesá se zralostí ovoce [1,10].

Černý rybíz obsahuje více než 150 aromatických sloučenin, které tvoří jeho specifické aroma [12]. Z aromatických látek jsou v plodech zastoupeny hlavně estery kyselin, aldehydy a silice [10].

Důležitý je i obsah fenolických látek, což jsou sekundární metabolity rostlin, které chrání rostlinu proti UV záření a patogenům. Jejich množství do značné míry závisí na odrůdě rybízu. Nejvíce zastoupenou skupinou fenolických látek v rybízu jsou anthokyany, které

mají význam jako přírodní barviva. Celkový obsah fenolických látek v černém rybízu je velmi variabilní, pohybuje se v rozmezí 227–789 mg na 100 g čerstvých plodů [1,13].

2.3 Využití černého rybízu v potravinářství

Černý rybíz je vysoce hodnotná potravina patřící mezi rostlinné antioxidanty. Je výborným zdrojem vitamínu C a mnoha dalších esenciálních nutričních látek. Konzumace 100 g černého rybízu pokrývá 2–12 % doporučené denní dávky makroprvků a mikroprvků. Plody obsahují pektiny a významné množství resveratrolu. Specifické aroma mají plody a listy černého rybízu díky obsahu éterických silic [14,15].

Černý rybíz je bohatý na fenolické látky a anthokyany. Fenolické látky patří k nejúčinnějším přírodním látkám působícím proti volným radikálům. Proto mohou lidské tělo chránit před oxidačním stresem, který způsobuje stárnutí a řadu onemocnění. Fenolické látky se v potravinářském průmyslu používají také jako barviva a konzervační látky přírodního původu. Anthokyany jsou červeně, fialově nebo modře zbarvené sloučeniny patřící mezi přírodní potravinářská barviva, která se do potravin nejčastěji aplikují ve formě koncentrátů. Jako potravinářská aditiva se označují kódem E163 [14,15].

Plody černého rybízu jsou v České republice průmyslově zpracované do formy nealkoholických nápojů, ovocných vín, likérů, džemů, čajů, dětské výživy, kompotů a potravinářských koncentrátů. Výjimečně se na našem trhu objevuje černý rybíz v čerstvé stolní variantě [15].



Obrázek 4: džem Via Dalicia, nektar Cappy, víno rybízák, čaj Apotheke

Vedlejší produkt při průmyslovém zpracování plodů rybízu obsahující slupky a semena je obvykle nevyužitý. Ze semen černého rybízu lze získávat olej, který obsahuje různé nutričně významné mastné kyseliny a antioxidanty [14, 16]. V kosmetickém,

potravinářském a farmaceutickém průmyslu se také využívají listy a pupeny černého rybízu, které jsou získávané v období vegetačního klidu pro jejich charakteristickou barvu a vůni [15,17].



Obrázek 5: Olej ze semen černého rybízu Biopurus, tinktura z pupenů černého rybízu Naděje

2.4 Fenolické látky

Fenolické látky jsou sekundární metabolity rostlin a hub, které chrání rostlinu proti UV záření, hmyzu, virům a bakteriím. Obsah fenolických látek v plodech je ovlivněna stupněm zralosti při sklizni, kultivarem, podmínkami pěstování, skladováním a zpracováním [18, 19].

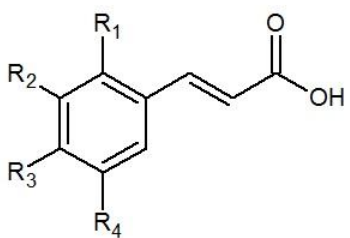
Fenolické látky se skládají z jednoho nebo více aromatických kruhů s různými stupni hydroxylace, methoxylace a glykosylace, což přispívá k barvě, svravosti a hořkosti. V bobulovém ovoci rozdělujeme fenolické látky na fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny a tanniny [20].

2.4.1 Fenolické kyseliny

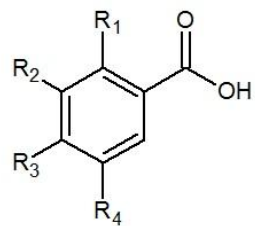
Součástí všech rostlinných materiálů jsou fenolické kyseliny, které lze rozdělit do dvou skupin: deriváty odvozené od benzoové kyseliny a deriváty odvozené od kyseliny skořicové. Tyto sloučeniny obsahují alespoň jeden aromatický kruh, přičemž alespoň jeden atom vodíku je nahrazen hydroxylovou skupinou. Vyskytují se převážně vázané, volné fenolické kyseliny se vyskytují jen zřídka, většinou maximálně 5 % z celkového objemu fenolických kyselin [19, 20].

Nejběžnějšími deriváty kyseliny skořicové identifikované v bobulích černého rybízu jsou kyselina ferulová, hydroxykávová, kávová, m-kumarová, p-kumarová a sinapová (Tabulka 6). Deriváty kyseliny benzoové zastupují kyselina gentisová, gallová, p-hydroxybenzoová, protokatechinová, salicylová a vanilová (Tabulka 7) [20].

Tabulka 6: deriváty kyseliny skořicové

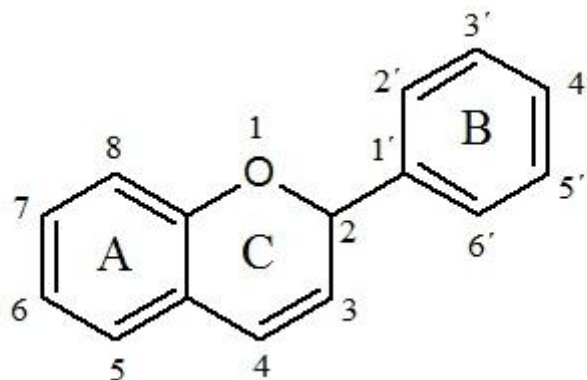
Kyselina skořicová ($R_{1-4} = H$)	R_1	R_2	R_3	R_4	Název
	H	OCH ₃	OH	H	felurová kyseliny
	H	OH	OH	H	kávová kyselina
	H	OH	OH	OH	hydroxykávová kyselina
	H	OH	H	H	m-kumarová kyselina
	H	H	OH	H	p-kumarová kyselina
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	sinapová kyselina

Tabulka 7: deriváty kyseliny benzoové

Kyselina benzoová ($R_{1-4} = H$)	R_1	R_2	R_3	R_4	Název
	OH	H	H	OH	gentisová kyselina
	OH	OH	OH	H	gallová kyselina
	H	OH	H	H	p-hydroxybenzoová kyselina
	OH	OH	H	H	protokatechinová kyselina
	OH	H	H	H	salicylová kyseliny
	OCH ₃	OH	H	H	vanilová kyselina

2.4.2 Flavonoidy

Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů. Jejich molekula obsahuje dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem. U většiny flavonoidů je C₃ řetězec součástí pyranového kruhu. Základní strukturou flavonoidů je flavan (obrázek viz níže), který obsahuje dva aromatické kruhy propojené kyslíkatým heterocyklem se třemi uhlíkatými atomy. Podle stupně oxidace C₃ řetězce se rozeznávají následující základní struktury: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny [21].



Flavan

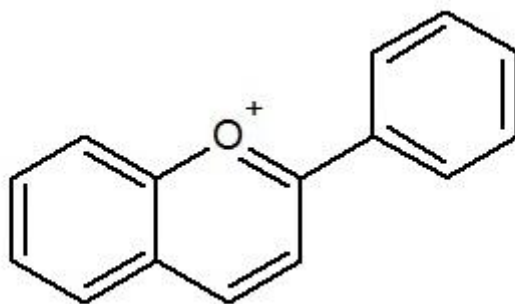
Dnes je známo více než 4000 flavonoidních látek. Některé flavonoidy jsou přírodní rostlinná barviva, jiné jsou významné pro svoji chuť nebo mají významné biologické účinky [21].

Katechiny a leukoanthokyanidiny jsou bezbarvé sloučeniny, při jejich enzymatickém hnědnutí vznikají hnědé pigmenty, které jsou barvivy řady potravin. Z leukoanthokyanidinů mohou při zpracování ovoce a zeleniny vznikat v kyselém prostředí příslušné barevné anthokyanidiny. Flavanony a flavanonoly jsou bezbarvé nebo světle žluté sloučeniny, jako barviva nemají velký význam. Flavony a flavonoly jsou žlutě zbarvené sloučeniny, které společně s anthokyany žluté, oranžové, červené až modré barvy představují nejvýznamnější flavonoidní barviva [21].

2.4.2.1 Anthokyany

Anthokyany nebo také anthokyaniny jsou velice rozšířenou skupinou ve vodě rozpustných rostlinných barviv. Vyskytují se v mnoha druzích rostlin, kde jsou lokalizovány v buněčných vakuolách. Potravinářsky významné rostliny obsahující tyto barviva jsou z čeledi révovitých (hrozny révy vinné), růžovitých (švestky, ostružiny), lomikamenovitých (černý a červený rybíz, červené odrůdy angreštu), vřesovcovitých (borůvka), brukvovitých (červené zelí) a dalších [21].

Anthokyany jsou glykosidy aglykonů, které se nazývají anthokyanidiny. Jsou odvozeny od základní struktury, kterou je flavyliový kation (obrázek viz níže). Volné aglykony anthokyanidiny se vyskytují zřídka. Ve všech rostlinných materiálech jsou ve formě glykosidů anthokyanidinů. V potravinách má význam 6 anthokyanidinů: pelargonidin, kyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin, malvidin. V některém ovoci a zelenině jsou přítomny anthokyany odvozené od jediného anthokyanidinu (například červené zelí), v jiných jsou odvozeny od několika různých anthokyanidinů (u černého rybízu jsou to deriváty sanidinu a delphinidinu) [21].



Flavyliový kation

Anthokyaniny se používají jako potravinářská barviva. Jsou vhodné pro kyselé potraviny, jelikož mají intenzivní barvu v prostředí o pH menším než 3,5. Zdroje těchto barviv jsou omezeny dostupností rostlinného materiálu a celkovými ekonomickými podmínkami. Nejčastěji se k barvení potravin používají anthokyanová barviva izolovaná z hroznů révy vinné, bezu černého a aronie [21].

2.4.3 Stilbeny

Stilbeny jsou strukturou a biochemickým původem podobné flavonoidům. Jsou to deriváty uhlovodíku stilbenu. Přirozeně vyskytující se stilbeny jsou substituované sloučeniny s dvěma benzenovými kruhy spojenými alifatickým řetězcem, se strukturou C6-C2-C6. Jako deriváty stilbenu se vyskytují volně nebo jako glykosidy. Řada těchto sloučenin vykazuje významné biologické vlastnosti, uplatňují se například jako antimikrobiální látky [21].

2.4.4 Tanniny

Tanniny můžeme rozdělit na hydrolyzované a kondenzované. Hydrolyzované tanniny jsou estery kyseliny gallové nebo ellagové s vázanou glukózou. Produkty jejich oxidačních reakcí se nazývají gallotanniny a ellagotanniny [20]. Kondenzované tanniny (třísloviny) neboli proanthokyanidiny jsou rozmanité oligomery nebo polymery některých flavonoidních látek se strukturou flavanu. Oligomery vzniklé kondenzací 2–10 flavanových jednotek, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje kolem 5 kDa mají svíravou hořkou chuť. Polymery s relativní molekulovou hmotností až do 400 kDa chuťové vlastnosti tříslovin nemají, ale jsou důležitou rolí při tvorbě zákalů a sedimentů vína, piva a ovocných šťáv. Kondenzované tanniny mají použití jako potravinářská aditiva [21].

2.4.5 Stanovení fenolických látek

Metody pro stanovení celkového obsahu fenolických látek jsou většinou založeny na oxidačně redukčních vlastnostech. Fenolické látky fungují jako redukční činidla. Nejpoužívanější metodou pro stanovení fenolických látek v rostlinných extraktech a šťávách je stanovení podle Folin-Ciocalteu. Existují i další metody pro stanovení obsahu fenolických látek, jako je metoda podle Price a Butlera a metoda s použitím aminoantipyrinu [22].

2.4.5.1 Stanovení podle Folin-Ciocalteua

Pro stanovení fenolických látek touto metodou se využívá speciálního činidla pojmenovaného po výše uvedených chemících. Folin-Ciocalteuovo činidlo je připraveno z wolframanu sodného, molybdenanu sodného, koncentrované kyseliny chlorovodíkové, kyseliny fosforečné, síranu lithného a vody [23]. Reakce je založena na oxidaci fosfowolframát-fosfomolybdenátovém komplexu fenolickými sloučeninami. Vznikají modré produkty reakce, jejichž množství je přímo úměrné množství přítomných fenolických látek [24]. Folin-Ciocalteuovo činidlo reaguje s širokým spektrem sloučenin, proto je absorpční pík široký a pro analýzu lze použít široký rozsah vlnových délek. Nejčastěji používané vlnové délky jsou 750, 760 a 765 nm. Kalibrační křivka se často tvoří pomocí kyseliny gallové. Výsledek koncentrace fenolických látek se pak vyjadřuje jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE) [25, 26].

2.4.5.2 Stanovení podle Price a Butlera

Při této reakci dochází k oxidaci fenolátového aniontu na fenolátový radikál a zároveň dochází k redukci hexakynoželezitanu na hexakynoželezitan. K roztoku vzorku je přidán hexakynoželezitan draselný spolu s chloridem železitým. Zelená barva roztoku se mění na modrou a vzniká sraženina Berlínské modři. Absorbance je měřena při vlnové délce 720 nm. Výsledná koncentrace se vyjadřuje jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE) [26].

2.4.5.3 Metoda s použitím aminoantipyrinu

Fenolické látky tvoří v přítomnosti oxidačního činidla barevný komplex s aminoantipyrinem. Vzorek obsahující fenolické látky je smíchán s aminoantipyrinem a alkalickým oxidačním činidlem, například hexakynoželezitanem draselným. Absorbance barevného komplexu je měřena při vlnových délkách 450 až 460 nm. Metoda je výhodná díky rychlému výsledku a použitelnosti pro široký rozsah koncentrací fenolických látek. Nicméně metoda není příliš citlivá [27].

2.5 Popis extrakčních postupů

Z hlediska fyzikální chemie je extrakce chápána jako přechod složky fázovým rozhraním mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami. Z širšího hlediska jsou jako extrakce pojmenovány i další metody, při nichž je převáděna složka směsi fázovým rozhraním z jedné fáze (plynné, kapalná, pevná) do druhé (kapalná, pevná), i když se principiálně jedná například o absorpci nebo adsorpci [28,29].

2.5.1 Extrakce potravinářských materiálů

U potravinářských materiálů mluvíme o extrakci pevných látek kapalinou. Tento proces se označuje jako vyluhování. Potravinářský materiál je považován za pevnou fázi, jako kapalina se používají voda, přísně vybraná organická rozpouštědla a oxid uhličitý v nadkritickém stavu. Extrakce má v potravinářských technologiích velký význam, využívá se k oddělování žádané látky z přírodního materiálu [29,30].

Selektivita většiny procesů extrakce včetně extrakce organickými rozpouštědly je prakticky nulová. Dostaneme vždy soubor látek, které jsou v použitém rozpouštědle rozpustné bez ohledu na jejich hodnotě rozpustnosti. V současné době je jediným používaným rozpouštědlem, které vykazuje selektivitu k některým extrahovaným látkám oxid uhličitý v nadkritickém stavu [30].

Extrakce z pevné fáze do kapaliny nejvíce ovlivňuje fyzikální stav pevné fáze, především stupeň a způsob narušení pevného materiálu. Dále se uplatňuje povaha extrahované látky a lokalizace extrahovaných látek (například cytosol buněk, součást buněčných stěn nebo membrán). Dalším parametrem je obsah vody v materiálu, v případě extrakce vodou není obsah vody v materiálu na závadu, Při použití jiných rozpouštědel je často nutné obsah vody v materiálu optimalizovat, většinou snižovat. Nutným předpokladem při extrakci je kontakt extrahované látky s použitým rozpouštědlem. Ve většině případů je nutné narušení rostlinných pletiv a dále přímo buněčných stěn. K docílení destrukce pletiv a buněk se často využívá proces lisování, který vede k vytvoření systému kapilár uvnitř zpracovávaného materiálu, čímž vzniká nový vnitřní prostor [30].

2.5.2 Dílčí kroky průběhu extrakce

- 1) Smočení povrchu pevné fáze, vstup rozpouštědla do kapilárního systému extrahovaného materiálu a jeho tok kapilárami.
- 2) Difuze rozpouštědla do vnitřních struktur materiálu. Kapilárami velikosti pod určitou mezí již rozpouštědlo neprochází, ale difunduje. Stejný mechanismus se uplatňuje u narušených buněk.
- 3) Rozpuštění extrahované látky v rozpouštědle.
- 4) Difuze roztoku extrahované látky v rozpouštědle z vnitřního povrchu materiálu do velkých kapilár.
- 5) Transport roztoku extrahované látky vnější difuzí do objemu rozpouštědla [30].

2.5.3 Jednostupňová extrakce

Jednostupňová extrakce se používá téměř výhradně ve vsádkovém režimu, kdy je do nádoby dána extrahovaná surovina a extrakční činidlo. Extrahovaná surovina musí být plně ponořena do rozpouštědla, které převažuje nad množstvím extrahované suroviny. Proto, aby byla extrakce účinná, je nutné materiálem míchat. Výsledná koncentrace extrahované látky je malá. Vsádkový režim extrakce je vhodný pro vyluhování. Extraktorem tohoto typu je například vsádkový ponorný extraktor [29,30].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Příprava výlisků a šťávy z plodů černého rybízu

3.1.1 Použité pomůcky a přístroje

ruční vinařský lis (BS vinařské potřeby, Česká republika)
plachetka
lednička s mrazničkou (Elektrolux s.r.o., Česká republika)

3.1.2 Původ rostlinného materiálu

Pro studium chemických charakteristik byly použity plody černého rybízu odrůdy Fokus. Plody pocházely z Výzkumného a šlechtitelského ústavu v Holovousích a byly sklizeny v létě roku 2016. Plody zbavené stopek byly převezeny v igelitových pytlích na Fakultu chemickou VUT v Brně, kde byly v igelitových sáčcích zamrazeny.

3.1.3 Příprava výlisků a šťávy

Byl sestaven vinařský lis s plachetkou. Plody černého rybízu byly vyjmuty z mrazáku, vloženy do lisu a ponechány rozmraznout při laboratorní teplotě. Z plodů byla vylisována šťáva, která byla v PET lahvích zamrazena. Získané výlisky byly rozprostřeny v tenké vrstvě na alobal a v sušárně sušeny při teplotě maximálně 45 °C do konstantní hmotnosti. Po usušení byly uchovávány v alobalu na suchém místě.

3.2 Příprava extraktů z výlisků černého rybízu vybranými postupy

3.2.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

běžné laboratorní sklo
mikrozkumavky
analytické váhy Pioneer (Ohaus, USA)
lednička s mrazničkou (Electrolux s.r.o., Česká republika)
ethanol (Lach-Ner s.r.o., Česká republika)

3.2.2 Extrakce suchých rybízových výlisků

Extrakce byly provedeny dvěma různými rozpouštědly.

Na analytických váhách bylo naváženo přesně 25,0 g výlisků. Výlisky byly převedeny do Erlenmeyerovy baňky a zality 100 ml rozpouštědla. Prvním rozpouštědlem byla voda, druhým směs 50 ml vody a 50 ml 96% ethanolu. Hrdlo baňky bylo přetaženo alobalem, směs byla důkladně promíchána a ponechána stát při laboratorní teplotě. V průběhu extrakce byly přesně v hodinových intervalech odebírány vzorky, poslední byl odebrán po 14 hodinách. Odběr vzorku byl proveden po promíchání směsi skleněnou pipetou do připravených mikrozkumavek. Vždy byl odebrán 1 ml extraktu a okamžitě přidán 1 ml rozpouštědla. Směs byla opět důkladně promíchána. Extrakty v mikrozkumavkách byly zamrazeny.

Po zjištění nejvyššího extraktu byla opakována extrakce daným rozpouštědlem ještě jednou a vzorky byly odebírány v nejlepší době extrakce, hodinu před a hodinu po nejlepší době extrakce. Při této opakované extrakci bylo odebráno vždy 20 ml extraktu a ten byl ve vhodných plastových nádobách zamražen.

3.3 Stanovení sušiny sušením

3.3.1 Použité pomůcky a přístroje

Petriho misky
exsikátor
analytické váhy Pioneer (Ohaus, USA)
sušárna Memmert UFE550 (Mettler, Německo)

3.3.2 Příprava vzorků a vlastní měření

Plody černého rybízu byly volně rozmrazeny při laboratorní teplotě. Petriho misky byly vysušeny v sušárně a po vychladnutí v exsikátoru byly zváženy na analytických vahách. Na analytických vahách bylo přesně zváženo několik plodů černého rybízu, plody byly před vložením do sušárny rozpůleny. Petriho misky s plody černého rybízu byly vloženy do sušárny a sušeny dva dny při teplotě 45°C, následně byla teplota zvýšena na 60°C a další den na 105°C. Sušení probíhalo do konstantní hmotnosti sušeného materiálu. Po vysušení byly Petriho misky přemístěny do exsikátoru a po vychladnutí zváženy na analytických vahách. Stanovení bylo provedeno třikrát.

3.3.3 Výpočet

Celkový obsah sušiny ve vzorku byl určen z podílu hmotnosti vzorku po vysušení a hmotnosti vzorku před vysušením. Výsledek byl vyjádřen v hmotnostních procentech. Celkový obsah sušiny byl vypočítán dle následující rovnice (1).

$$w_s = \frac{m_s}{m_n} \cdot 100 \% \quad 1$$

kde w_s je obsah sušiny (hm. %),

m_s hmotnost sušiny (g),

m_n je hmotnost původní navážky plodů (g).

3.4 Refraktometrické stanovení rozpustné sušiny

3.4.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

běžné laboratorní sklo
pasteurova pipeta
buničitá vata

Abbeho refraktometr (Zeiss, Německo)
ethanol (Lach-Ner s.r.o., Česká republika)

3.4.2 Příprava vzorků a vlastní měření

Šťáva i extrakty z černého rybízu byly rozmrazeny a v kádinkách naředěny destilovanou vodou v poměru 1:1.

Před měřením byla zkontrolována nulová poloha stupnice. Po odjištění hranolů byly plochy spodního i horního hranolu vyčištěny ethanolem a destilovanou vodou a vysušeny buničitou vatou. Na spodní hranol, který je ve vodorovné poloze, byla nanесena destilovaná voda pasteurovou pipetou a rozetřena po celé ploše skleněnou tyčinkou. Byl přiklopen horní hranol a zabezpečen klíčem. Sklon hranolů byl nastaven tak, aby rozhraní stínu a světla bylo v průsečíku nitkovitého kříže. Stupnice byla nastavena na nulu.

Hranoly byly osušeny a na spodní hranol ve vodorovné poloze byla nanесena kapka vzorku, která byla rozetřena skleněnou tyčinkou. Po ustálení teploty byl na stupnici odečten index lomu s přesností na čtyři desetinná místa. Stanovení každého vzorku bylo provedeno třikrát.

3.4.3 Výpočet

K odečtenému indexu lomu byla v tabulkách nalezena příslušná hodnota odpovídající množství sušiny vyjádřené v hmotnostních procentech sacharosy. Výsledné hodnoty byly přepočítány na původní vzorek vynásobením faktorem ředění. Ze tří paralelních stanovení byla vypočítána průměrná hodnota.

3.5 Stanovení celkových anthokyanových barviv pH diferenciální metodou

3.5.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

běžné laboratorní sklo
automatická pipeta Sartorius Proline 100–1000 µl (Biohit, Finsko)
automatická pipeta Sartorius Proline 0,5–5 ml (Biohit, Finsko)
skleněná kyveta
stojan na zkumavky
analytické váhy Pioneer (Ohaus, USA)
lednička s mrazničkou (Electrolux s.r.o., Česká republika)
pH metr Lab pH 50 (XC Instruments, Itálie)
magnetická míchačka Color Squid (IKA-Werke, Německo)
UV/VIS spektrofotometr Helios γ (ThermoSpectronic, Velká Británie)
chlorid draselný p.a. (Lachema, Česká republika)
koncentrovaná kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Penta, Česká republika)
sodná sůl kyseliny octové p.a. (Lachema, Česká republika)

3.5.2 Příprava roztoků

3.5.2.1 tlumivý roztok chloridu draselného o pH 1,0 a koncentraci $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Na analytických vahách bylo naváženo 1,86 g KCl a navážka byla kvantitativně převedena destilovanou vodou do kádinky. Do kádinky bylo přidáno 980 ml destilované vody. Kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku a do roztoku byla ponořena elektroda pH metru. Do roztoku byla po malých dávkách přidávána koncentrovaná kyselina chlorovodíková až do hodnoty pH 1,0. Pufr byl převeden do odměrné baňky na 1000 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku.

3.5.2.2 tlumivý roztok octanu sodného o pH 4,5 a koncentraci $0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Na analytických vahách bylo naváženo 54,43 g CH_3COONa a navážka byla kvantitativně převedena destilovanou vodou do kádinky. Do kádinky bylo přidáno 980 ml destilované vody a byla umístěna na magnetickou míchačku, kde byla do roztoku ponořena elektroda pH metru. Do roztoku byla postupně přidávána koncentrovaná kyselina chlorovodíková až do hodnoty pH 4,5. Pufr byl převeden do odměrné baňky na 1000 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku.

3.5.3 Příprava vzorků a samotné měření

Šťáva a extrakty z černého rybízu byly rozmrazeny. Šťáva byla v odměrné baňce na 100 ml naředěna destilovanou vodou v poměru 1:99. Extrakty byly dle intenzity zabarvení naředěny v odměrných baňkách na 10 ml destilovanou vodou v poměru 0,5:9,5 a 0,4:9,6.

Do zkumavky bylo nepipetováno 2,5 ml pufru chloridu draselného ($0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 0,5 ml naředěného vzorku. Do druhé zkumavky bylo napipetováno 2,5 ml pufru octanu sodného ($0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 0,5 ml naředěného vzorku. Zkumavky byly promíchány a každý připravený vzorek byl proměřen na spektrofotometru při vlnových délkách 510 nm a 700 nm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda. Každé stanovení bylo provedeno třikrát.

3.5.4 Výpočet

Celková koncentrace anthokyanů, vyjádřená jako ekvivalent kyanidu-3-rutinosidu (CRE) byla vypočtena z následující rovnice (2):

$$c_{MP} = \frac{A \cdot M \cdot F \cdot 10^3}{\varepsilon \cdot l} \quad 2$$

kde c_{MP} je výsledná koncentrace monomerního pigmentu ve vzorku ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$),

A je výsledná hodnota absorpance vypočítaná dle rovnice (3),

M je molekulová hmotnost pro kyanidin-3-rutinosid ($595,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$),

F je faktor ředění,

ε je molární absorpční koeficient pro kyanidin-3-rutinosid ($28\,800 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$),

l je délka dráhy průchodu světla vzorkem, což odpovídá délce kyvety (cm).

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH\ 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH\ 4,5} \quad 3$$

Celková koncentrace anthokyanů byla přepočtena na obsah anthokyanů ve vzorku v mg na 100 g sušených výlisků a pro šťávu v mg na 100 g šťávy.

3.6 Stanovení celkových fenolických látek podle Folin-Ciocalteua

3.6.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

běžné laboratorní sklo
automatická pipeta Sartorius Proline 100–1000 μ l (Biohit, Finsko)
automatická pipeta Sartorius Proline 0,5–5 ml (Biohit, Finsko)
skleněná kyveta
stojan na zkumavky
analytické váhy Pioneer (Ohaus, USA)
lednička s mrazničkou (Electrolux s.r.o., Česká republika)
pH metr Lab pH 50 (XC Instruments, Itálie)
magnetická míchačka Color Squid (IKA-Werke, Německo)
UV/VIS spektrofotometr Helios γ (ThermoSpectronic, Velká Británie)
bezvodý uhličitán sodný (Lach-Ner s.r.o, Česká republika)
Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
kyselina gallová (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

3.6.2 Příprava roztoků

3.6.2.1 *standardní roztok kyseliny gallové o koncentraci 1 g·l⁻¹*

Na analytických vahách bylo naváženo 0,1 g kyseliny gallové. Navážka byla rozpuštěna v 90 ml destilované vody a kvantitativně převedena do odměrné baňky na 100 ml, kde byl roztok doplněn po rysku destilovanou vodou.

3.6.2.2 *7,5% roztok uhličitanu sodného*

Na analytických vahách bylo naváženo 7,5 g uhličitanu sodného. Navážka byla rozpuštěna v 90 ml destilované vody a kvantitativně převedena do odměrné baňky na 100 ml. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

3.6.2.3 *kalibrační řada*

Byla připravena řada pěti kalibračních roztoků o koncentracích 12,5; 25; 50; 100 a 200 mg·l⁻¹. Do pěti odměrných baněk bylo postupně nepipetováno 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 a 2,0 ml standardního roztoku kyseliny gallové a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Do zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml Folin-Ciocalteuova činidla, dále 1,8 ml destilované vody a 0,1 ml kalibračního standardu. Roztoky byly promíchány a ponechány stát 5 minut. Následně byl do každé zkumavky přidán 1,0 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a obsah byl promíchán. Roztoky byly ponechány stát 2 hodiny a poté byly

proměřeny na spektrofotometru při vlnové délce 750 nm. Slepý vzorek byl připraven stejně jako kalibrační řada, avšak místo kalibračního standardu byl přidán stejný objem destilované vody.

3.6.3 Příprava vzorků a samotné měření

Šťáva a extrakty z černého rybízu byly rozmrazeny. V odměrné baňce na 100 ml byly naředěny destilovanou vodou v poměru 1:99.

Do zkumavky bylo nepipetováno 0,1 ml Folin-Ciocalteuova činidla, dále 1,8 ml destilované vody a 0,1 ml roztoku vzorku. Roztoky byly promíchány a ponechány stát 5 minut. Následně byl do každé zkumavky přidán 1,0 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a obsah byl promíchán. Roztoky byly ponechány stát 2 hodiny a poté byly proměřeny na spektrofotometru při vlnové délce 750 nm. Slepý vzorek byl připraven stejně, avšak místo vzorku byl přidán stejný objem destilované vody. Pro každý vzorek bylo provedeno stanovení třikrát.

3.6.4 Výpočet

Z rovnice regrese (4) kalibrační křivky (Obrázek 15) byl vypočítán celkový obsah fenolických látek ve vzorcích jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE) v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$:

$$A = 0,004046 \cdot c + 0,01204 \quad 4$$

Výsledná koncentrace fenolických látek byla vyjádřena jako ekvivalent kyseliny gallové v mg na 100 g sušených výlisků a pro šťávu jako ekvivalent kyseliny gallové v mg na 100 g šťávy.

3.7 Stanovení redukujících cukrů podle Bertranda a gravimetricky

3.7.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

běžné laboratorní sklo

byreta

nedělené pipety

filtrační kelímek S4

vodní vývěva

exsikátor

mraznička s ledničkou (Electrolux s.r.o., Česká republika)

předvážky A&D Instruments EK-600H (A&D Instruments, Japonsko)

analytické váhy Pioneer (Ohaus, USA)

magnetická míchačka Color Squid (IKA-Werke, Německo)

elektrický vařič (ETA, Česká republika)

sušárna Memmert UFE550 (Memmert, Německo)

pentahydrát síranu měďnatého p.a. (Lach-Ner s.r.o, Česká republika)

vínan draselno-sodný p.a. (Penta, Česká republika)

hydroxid sodný (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

síran železitý p.a. (Chemapol, Česká republika)
koncentrovaná kyselina sírová (Lach-Ner s.r.o., Česká republika)
manganistan draselný (Mach chemikálie s.r.o., Česká republika)
dihydrát kyseliny šťavelové (Chemapol, Česká republika)
ethanol (Lach-Ner s.r.o., Česká republika)

3.7.2 Příprava roztoků

3.7.2.1 *Fehlingův roztok I*

Na předvážkách bylo naváženo 69,30 g pentahydrátu síranu měďnatého. Navážka byla kvantitativně převedena destilovanou vodou do odměrné baňky o objemu 1000 ml. Baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku a roztok byl promíchán.

3.7.2.2 *Fehlingův roztok II*

Bylo naváženo 346 g vínanu sodno-draselného a 150 g hydroxidu sodného. Navážky byly kvantitativně převedeny destilovanou vodou do odměrné baňky na 1000 ml a po rozpuštění byla baňka doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl promíchán.

3.7.2.3 *roztok síranu železitého*

Navážka 50 g síranu železitého byla rozpuštěna v 500 ml destilované vody. Za stálého míchání a chlazení bylo přidáno 109 ml koncentrované kyseliny sírové. Po ochlazení byl roztok v odměrné baňce na 1000 ml doplněn destilovanou vodou po rysku a promíchán.

3.7.2.4 *roztok manganistanu draselného o koncentraci $0,02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$*

Navážka 3,30 g manganistanu draselného byla kvantitativně převedena destilovanou vodou do odměrné baňky na 1000 ml. Po rozpuštění byla baňka doplněna po rysku destilovanou vodou a roztok byl promíchán.

3.7.2.5 *roztok kyseliny sírové o koncentraci $4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$*

V odměrné baňce na 250 ml bylo 55,5 ml koncentrované kyseliny sírové doplněno po značku destilovanou vodou a roztok byl důkladně promíchán.

3.7.2.6 *standardní roztok kyseliny šťavelové o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$*

Na analytických vahách bylo naváženo 0,6326 g dihydrátu kyseliny šťavelové. Navážka byla kvantitativně převedena destilovanou vodou do odměrné baňky na 100 ml a po úplném rozpuštění kyseliny šťavelové byla odměrná baňka doplněna destilovanou vodou po rysku.

Přesná koncentrace standardního roztoku kyseliny šťavelové byla vypočtena podle vztahu (5):

$$c_{\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4} = \frac{m}{M \cdot V} \quad 5$$

kde $c_{\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4}$ je koncentrace kyseliny šťavelové ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$),

m je přesná navážka dihydrátu kyseliny šťavelové (g),

M je molární hmotnost kyseliny šťavelové ($126,07 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$),

V je konečný objem roztoku v odměrné baňce (100 ml).

3.7.2.7 *standardizace odměrného roztoku manganistanu draselného*

Do titrační baňky bylo nedělenou pipetou pipetováno 10 ml standardního roztoku kyseliny šťavelové, roztok byl okyselen 5 ml kyseliny sírové o koncentraci $4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a z byrety byl přidán 1 ml odměrného roztoku manganistanu draselného. Titrační baňka byla na vařiči zahřátá asi na 60°C a po odbarvení byl roztok titrován až do prvního slabě růžového zbarvení, které vydrželo nejméně 30 sekund. Titrace byla provedena třikrát a byla vypočítána průměrná spotřeba.

Přesná koncentrace odměrného roztoku manganistanu draselného byla vypočtena podle vztahu (6):

$$c_{\text{KMnO}_4} = \frac{2 \cdot m \cdot V_2}{5 \cdot M \cdot V_1 \cdot V_e} \quad 6$$

kde c_{KMnO_4} je koncentrace roztoku KMnO_4 ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$),

m je navážka dihydrátu kyseliny šťavelové z kapitoly 3.7.2.6 (g),

V_2 je objem roztoku kyseliny šťavelové, který byl pipetován do titrační baňky (0,01 l),

M je molární hmotnost dihydrátu kyseliny šťavelové ($126,07 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$),

V_1 je objem odměrné baňky (0,1 l),

V_e je objem spotřebovaného KMnO_4 při titraci (l).

3.7.3 *Příprava vzorků a samotné měření*

Šťáva a extrakty z černého rybízu byly rozmrazeny. Do odměrné baňky na 100 ml byly pipetovány 2 ml šťávy nebo extraktu a odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou a roztok byl promíchán.

3.7.3.1 *Stanovení redukujících cukrů podle Bertranda*

Do Erlenmeyerovy baňky bylo pipetováno 20 ml Fehlingova roztoku I a 20 ml Fehlingova roztoku II. Směs byla zahřátá na 60°C a bylo přidáno 10 ml roztoku vzorku a směs byla na vařiči zahřívána k varu. Var byl udržován přesně 2 minuty. Po 2 minutách varu byla baňka zchlazena pod proudem studené vody. Směs byla filtrována přes filtrační kelímek S4. Vzniklý oxid měďný byl neustále udržován pod hladinou. Sraženina na filtračním kelímku byla promyta horkou vodou. Kelímek byl umístěn na čistou odsávací baňku a sraženina byla rozpuštěna postupným přidáváním 50 ml roztoku síranu železitého. Roztok v odsávací baňce byl ihned titrován odměrným roztokem manganistanu draselného do slabě růžového zbarvení. Pro každý vzorek bylo stanovení provedeno jednou.

3.7.3.2 Stanovení redukujících cukrů gravimetricky

Do Erlenmeyerovy baňky bylo nedělenou pipetou pipetováno 20 ml Fehlingova roztoku I a 20 ml Fehlingova roztoku II. Směs byla zahřátá na 60 °C a bylo přidáno 10 ml roztoku vzorku a směs byla na vařiči zahřívána k varu. Var byl udržován přesně 2 minuty. Po 2 minutách varu byla baňka chlazená pod proudem studené vody. Směs byla filtrována přes filtrační kelímek S4. Vzniklý oxid měďný byl neustále udržován pod hladinou. Sraženina na filtračním kelímku byla promyta horkou vodou a třikrát ethanolem. Filtrační kelímek byl vložen do vyhřáté sušárny na 45 minut při teplotě 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru byl kelímek zvážen. Pro každý vzorek bylo stanovení provedeno dvakrát.

3.7.4 Výpočet

Výsledná hodnota obsahu redukujících cukrů v hmotnostních procentech, byla získána jako průměrná hodnota zjištěného obsahu redukujících cukrů metodou podle Bertranda a gravimetrickou metodou.

3.7.4.1 výpočet obsahu redukujících cukrů stanovených metodou podle Bertranda

Spotřeba 1 ml roztoku manganistanu draselného o koncentraci 0,0200 mol·l⁻¹ odpovídá 3,315 mg redukujících cukrů. Množství redukujících cukrů, které odpovídají spotřebě 1 ml roztoku manganistanu draselného o koncentraci 0,0204 mol·l⁻¹, bylo vypočítáno podle vztahu (7):

$$m_{1\text{ ml}} = \frac{c_{KMnO_4} \cdot m_{3,315}}{c_{0,020}} \quad 7$$

kde $m_{1\text{ ml}}$ je množství redukujících cukrů, které odpovídá spotřebě 1 ml roztoku manganistanu draselného o koncentraci 0,0204 mol·l⁻¹ (mg),

c_{KMnO_4} přesná koncentrace při titraci použitého manganistanu draselného (mol·l⁻¹),

$c_{0,020}$ je koncentrace 1 ml spotřebovaného manganistanu draselného při titraci, který odpovídá 3,315 mg redukujících cukrů (0,020 mol·l⁻¹),

$m_{3,315}$ je hmotnost redukujících cukrů odpovídající spotřebě 1 ml manganistanu draselného (3,315 mg).

Množství redukujících cukrů odpovídající skutečné spotřebě manganistanu draselného, bylo vypočítáno na základě toho, že 1 ml manganistanu draselného o koncentraci 0,0204 mol·l⁻¹ odpovídá 3,378 g redukujících cukrů, výpočet byl proveden podle rovnice (8):

$$m = \frac{V_{sp} \cdot 3,378}{1} \quad 8$$

kde m je množství redukujících cukrů odpovídající skutečné spotřebě manganistanu draselného (mg),

V_{sp} je spotřeba roztoku manganistanu draselného (ml).

Obsah redukujících cukrů ve vzorku v hmotnostních procentech byl vypočítán dle rovnice (9):

$$w = \frac{m}{m_{vz}} \cdot 100 \quad 9$$

kde w je obsah redukujících cukrů ve vzorku (% hm.),

m je množství redukujících cukrů odpovídající spotřebě manganistanu draselného pro titraci (g),

m_{vz} je hmotnost vzorku v roztoku (g).

3.7.4.2 výpočet obsahu redukujících cukrů stanovených gravimetrickou metodou

Množství redukujících cukrů bylo vypočteno na základě toho, že 1 mg oxidu měďného odpovídá 0,462 mg redukujících cukrů, podle rovnice (10).

$$m = \frac{m_{Cu_2O} \cdot 0,462}{1} \quad 10$$

kde m je množství redukujících cukrů odpovídající množství vyloučeného oxidu měďného (mg),

m_{Cu_2O} je množství vyloučeného oxidu měďného (mg).

Obsah redukujících cukrů ve vzorku v hmotnostních procentech byl vypočítán dle rovnice (11):

$$w = \frac{m}{m_{vz}} \cdot 100 \quad 11$$

kde w je obsah redukujících cukrů ve vzorku (% hm.),

m je množství redukujících cukrů odpovídající spotřebě manganistanu draselného pro titraci (g),

m_{vz} je hmotnost vzorku v roztoku (g).

3.8 Stanovení pH

3.8.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

běžné laboratorní sklo

pH metr Lab pH 50 (XC Instruments, Itálie)

magnetická míchačka Color Squid (IKA-Werke, Německo)

3.8.2 Příprava vzorků a samotné měření

Šťáva a extrakty z černého rybízu byly rozmrazeny. pH metr byl kalibrován tlumivými roztoky 7,00 a 4,00. Do kádinky bylo pipetováno 25 ml vzorku a kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku. Do roztoku byla ponořena elektroda pH metru a bylo změřeno pH za stálého míchání vzorku. Měření bylo pro každý vzorek provedeno třikrát. Z naměřených hodnot byla vypočítána průměrná hodnota.

3.9 Stanovení titrovatelných kyselin

3.9.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

běžné laboratorní sklo
skleněná byreta
pH metr Lab pH 50 (XC Instruments, Itálie)
magnetická míchačka Color Squid (IKA-Werke, Německo)
analytické váhy Pioneer (Ohaus, USA)
předvážky A&D Instruments EK-600H (A&D Instruments, Japonsko)
hydroxid sodný (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
dihydrát kyseliny šťavelové (Lachema, Česká republika)
fenolftalein (Lachema, Česká republika)

3.9.2 Příprava roztoků

3.9.2.1 *odměrný roztok hydroxidu sodného o koncentraci 0,25 mol·l⁻¹*

Na předvážkách bylo naváženo 10,00 g hydroxidu sodného, který byl kvantitativně převeden destilovanou vodou do odměrné baňky na 1000 ml. Po úplném rozpuštění hydroxidu sodného byla baňka doplněna destilovanou vodou po rysku. Odměrný roztok byl před stanovením vzorku standardizován na kyselinu šťavelovou.

3.9.2.2 *standardní roztok kyseliny šťavelové o koncentraci 0,1 mol·l⁻¹*

Na analytických vahách bylo naváženo 1,2640 g dihydrátu kyseliny šťavelové. Navážka byla kvantitativně převedena destilovanou vodou do odměrné baňky na 100 ml a po úplném rozpuštění kyseliny šťavelové byla odměrná baňka doplněna destilovanou vodou po rysku.

Přesná koncentrace standardního roztoku kyseliny šťavelové byla vypočtena podle rovnice (12):

$$c_{C_2H_2O_4} = \frac{m}{M \cdot V} \quad 12$$

kde $c_{C_2H_2O_4}$ je koncentrace kyseliny šťavelové (mol·l⁻¹),

m je přesná navážka dihydrátu kyseliny šťavelové (g),

M je molární hmotnost kyseliny šťavelové ($126,07 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$),

V je konečný objem roztoku v odměrné baňce (100 ml).

3.9.2.3 Standardizace odměrného roztoku hydroxidu sodného

Do titrační baňky bylo pipetováno 10,00 ml roztoku kyseliny šťavelové. K roztoku byly přidány 3 kapky fenolftaleinu a roztok byl titrován odměrným roztokem hydroxidu sodného do trvale růžového zbarvení. Standardizace byla provedena třikrát. Z průměrné spotřeby hydroxidu sodného při titraci byla vypočítána přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného podle rovnice (13):

$$c_{\text{NaOH}} = \frac{2 \cdot c_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4} \cdot V_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4}}{V_{\text{NaOH}}} \quad 13$$

kde c_{NaOH} je koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$),

$c_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4}$ je koncentrace roztoku kyseliny šťavelové ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$),

$V_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4}$ je objem roztoku kyseliny šťavelové, který byl použit k titraci (ml),

V_{NaOH} je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu (ml).

3.9.3 Příprava vzorků a samotné stanovení

Šťáva a extrakty z černého rybízu byly rozmrazeny. Extrakty byly naředěny destilovanou vodou v poměru 1:9.

pH metr byl kalibrován tlumivými roztoky o pH 7,00 a 4,00. Do kádinky bylo pipetováno 20 ml vzorku. Kádinka se vzorkem byla umístěna na magnetickou míchačku, do roztoku byla ponořena elektroda pH-metru a za stálého míchání byl roztok titrován odměrným roztokem hydroxidu sodného do pH 7,00. Titrace byla pro každý vzorek provedena třikrát.

Titrační kyselost se vyjadřuje v mmol H^+ iontů na 100 ml vzorku. Titrační kyselost byla vypočítána podle vztahu (14):

$$c_{\text{H}^+} = \frac{100 \cdot V_{\text{NaOH}} \cdot c_{\text{NaOH}}}{m_{\text{vz}}} \quad 14$$

kde V_{NaOH} je průměrná spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného (l),

c_{NaOH} je přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$),

m_{vz} je navážka vzorku (g).

3.10 Stanovení vitamínu C

3.10.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

běžné laboratorní sklo

filtrační papír
byreta
dělené a nedělené pipety
skleněná kyveta
skleněné zkumavky
předvážky A&D Instruments EK-600H (A&D Instruments, Japonsko)
analytické váhy Pioneer (Ohaus, USA)
elektrický vaříč (ETA, Česká republika)
spektrofotometr Helios γ (ThermoSpectronic, Velká Británie)
lednička s mrazničkou (Electrolux s.r.o., Česká republika)
kyselina metafosforečná p. a. (Lachema, Česká republika)
ledová kyselina octová (Lach-Ner s.r.o., Česká republika)
bezvodý octan sodný (Lachema a.s., Česká republika)
kyselina octová 80 % ((Lach-Ner s.r.o., Česká republika)
sodná sůl 2,6-dichlorfenolindofenolu (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
hydroxid sodný (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
kyselina askorbová (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
xylen (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

3.10.2 Příprava roztoků

3.10.2.1 extrakční roztok kyseliny metafosforečné a kyseliny octové

V odměrné baňce na 500 ml bylo rozpuštěno 15 g kyseliny metafosforečné ve 40 ml ledové kyseliny octové a 200 ml vody, odměrná baňka byla doplněna po rysku a roztok byl zfiltrován přes filtrační papír.

3.10.2.2 tlumivý roztok octan sodný/kyselina octová o pH 4,0

75 g bezvodého octanu sodného bylo rozpuštěno v 175 ml destilované vody a 315 ml 80% kyseliny octové.

3.10.2.3 roztok barviva 2,6-dichlorfenolindofenol

V odměrné baňce na 200 ml bylo rozpuštěno 50 mg sodné soli 2,6-dichlorfenolindofenolu ve 150 ml destilované vody o teplotě 50 °C až 60 °C, obsahující 42 mg hydroxidu sodného. Roztok byl doplněn po rysku destilovanou vodou a zfiltrován.

3.10.2.4 standardní roztok kyseliny askorbové o koncentraci 1 g·l⁻¹

Na analytických váhách bylo naváženo přesně 0,100 mg kyseliny askorbové, navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky na 100 ml a doplněna extrakčním roztokem po rysku.

3.10.2.5 standardizace roztoku barviva 2,6-dichlorfenolindofenolu

K 1 ml standardního roztoku kyseliny askorbové v titrační baňce bylo přidáno 10 ml extrakčního roztoku. Byla provedena titrace barvivem 2,6-dichlorfenolindofenolem do růžového zbarvení. Jako slepý pokud byla provedena titrace 10 ml extrakčního roztoku.

Každá titrace byla provedena třikrát. Z průměrné hodnoty spotřeby barviva byl vypočítán faktor, který udává počet mg kyseliny askorbové, kterým odpovídá 1 ml titračního činidla, podle vztahu (15):

$$m_1 = \frac{V_a}{V_b - V_c} \quad 15$$

kde V_a je objem standardního roztoku kyseliny askorbové (1 ml),

V_b je spotřeba roztoku 2,6-dichlorfenolindofenolu na 1 ml standardního roztoku (ml),

V_c je spotřeba 2,6-dichlorfenolindofenolu na slepý pokud (ml).

3.10.2.6 příprava kalibrační křivky

Do pěti zkumavek bylo pipetováno 1 ml extrakčního roztoku a 1 ml tlumivého roztoku. Potom bylo postupně přidáno 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 ml roztoku barviva. Po promíchání bylo přidáno 10 ml xylenu. Zkumavky byly zazátkovány a prudce protřepávány 10 s. Po rozdělení vrstev byla změřena absorbance horní xylenové vrstvy ve skleněné kyvetě při 500 nm. Jako slepý pokud byla změřena absorbance xylenu při 500 nm.

3.10.3 Příprava vzorků a samotné stanovení

Šťáva a extrakty z černého rybízu byly rozmrazeny. Extrakty i šťáva byly naředěny extrakčním roztokem v poměru 2:3.

Do zkumavek bylo pipetováno 1 ml zředěného vzorku, 1 ml tlumivého roztoku a 3 ml barviva (u šťávy 4 ml barviva). Po promíchání bylo přidáno 10 ml xylenu. Zkumavky byly zazátkovány a prudce protřepávány 10 s. Po rozdělení vrstev byla změřena absorbance horní xylenové vrstvy ve skleněné kyvetě při 500 nm. Jako slepý pokud byla změřena absorbance xylenu při 500 nm. Měření bylo pro každý vzorek provedeno třikrát. Z naměřených hodnot byla vypočítána průměrná hodnota.

3.10.4 Výpočet

Z regresní rovnice (16) kalibrační křivka (Obrázek 16) byl vypočítán přebytek barviva odpovídající naměřené absorbanci vzorku:

$$A = 0,5218 \cdot V_1 + 0,0503 \quad 16$$

kde A je naměřená absorbance xylenové vrstvy,

V_1 je objem barviva odpovídající naměřené absorbanci (ml).

Obsah kyseliny askorbové vyjádřený v mg na 100 g vzorku se vypočte podle vztahu (17):

$$c = \frac{(V_0 - V_1) \cdot m_1}{m_0} \cdot 100 \quad 17$$

kde c je obsah kyseliny askorbové ve vzorku ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g vzorku}$),

V_0 je objem roztoku barviva spotřebovaný při redukci (ml),

V_I je objem přebytku barviva vypočítaný z regresní rovnice (ml),

m_I je hmotnost kyseliny askorbové odpovídající 1 ml roztoku barviva (mg),

m_0 je hmotnost vzorku v alikvotní části, která byla použita pro stanovení (g).

3.11 Statistické zpracování naměřených dat

Z naměřených dat byl při zpracování spočítaný průměr a směrodatná odchylka. Naměřená data byla zpracována pomocí statistických funkcí Microsoft Excel; průměr hodnot prostřednictvím funkce PRŮMĚR a směrodatná odchylka prostřednictvím funkce SMODCH.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této bakalářské práci byly stanoveny vybrané chemické a fyzikální charakteristiky šťávy z černého rybízu a extraktů z jeho výlisků. Stanovené hodnoty byly vzájemně porovnány a diskutovány.

Šťáva z černého rybízu a extrakty z výlisků byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.1.3.

4.1 Výběr rozpouštědla pro extrakci výlisků

Volba rozpouštědla vycházela z poznatků uvedených v bakalářské práci Terezy Loškové [31]. Zároveň se přihlíželo k tomu, aby finanční náročnost extrakčního procesu byla co nejnižší.

Pro extrakci byly zvoleny dva druhy rozpouštědel – voda a směs vody a ethanolu v poměru 1 : 1 objemově. Obě rozpouštědla je možno používat v potravinářském průmyslu. Extrakce probíhaly za laboratorní teploty postupem uvedeným v kapitole 3.2.2.

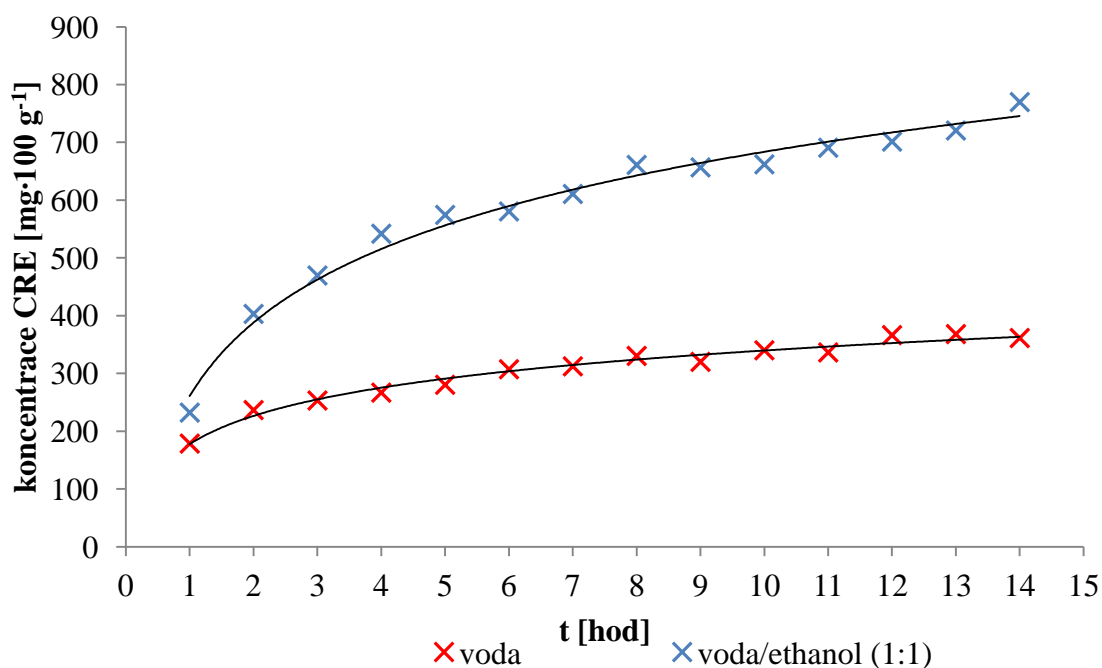
Jako parametr kvality extrakce bylo zvoleno množství obsažených anthokyanových barviv. Jejich celkový v jednotlivých odebraných extraktech byl stanoven pH diferenciální metodou, která je popsána v kapitole 3.5.

Obsah antokyanových barviv je ve všech tabulkách a grafech uveden jako ekvivalent monomerního pigmentu kyanidin-3-rutinosidu (CRE), který je majoritním antokyanovým barvivem černého rybízu.

Výsledky stanovení obsahu celkových anthokyanů v extraktu v závislosti na době extrakce jsou pro obě rozpouštědla uvedeny v následující tabulce (Tabulka 8) a časový průběh extrakcí je znázorněný na obrázku (Obrázek 6).

Tabulka 8: Obsah celkových anthokyanových barviv v extraktech výlisků z černého rybízu

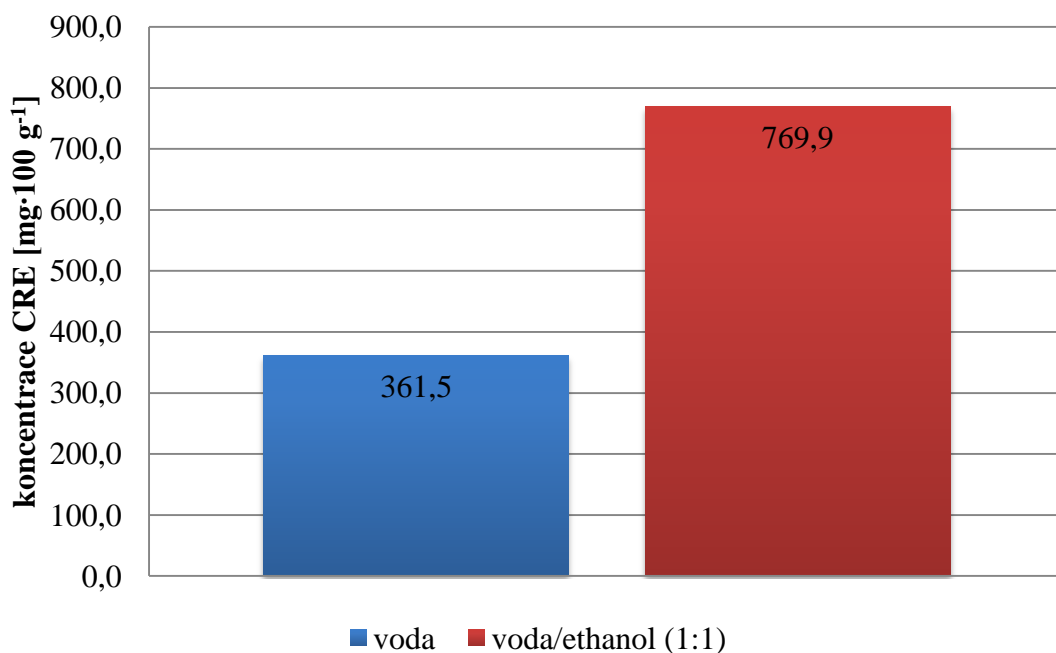
doba extrakce [hod]	mg CRE·100 g ⁻¹	
	voda	voda/ethanol (1 : 1 obj.)
1	178,8	232,4
2	236,8	403,2
3	253,4	469,8
4	267,0	542,0
5	280,6	574,6
6	307,4	580,6
7	312,5	610,8
8	330,5	661,1
9	320,3	656,9
10	340,2	662,2
11	336,6	690,9
12	366,5	701,5
13	368,3	720,7
14	361,5	769,9



Obrázek 6: Porovnání časové závislosti extrakce výlisků dvěma rozpouštědly

Z grafického znázornění časových průběhů extrakcí je patrné, že maximální koncentrace anthokyanových barviv v extraktu bylo dosaženo extrakcí směsí voda a ethanol v poměru 1:1. Toto rozpouštědlo téměř dvakrát účinnější než extrakce vodou. Doba extrakce, dostačující pro maximální výtěžek anthokyanů, byla 14 hodin.

Koncentrace anthokyanových barviv v čase 14 hodin je pro obě rozpouštědla vynesena ve sloupovém diagramu na obrázku (Obrázek 7).



Obrázek 7: Porovnání obsahu anthokyanových barviv v extraktech v čase 14 hodin

Extrakcí vodou o laboratorní teplotě v čase 14 hodin byl výtěžek anthokyanových barviv 361,5 mg CRE ve 100 g suchých výlisků. Při extrakci směsí voda/ethanol v poměru 1 : 1 při laboratorní teplotě byl výtěžek 769,9 mg CRE ve 100 g výlisků, což je dvakrát více.

Pro stanovení všech vybraných výše uvedených charakteristik extraktu byly výlisky extrahovány ještě jednou a za použití ověřeného lepšího extrakčního činidla (voda/ethanol v objemovém poměru 1 : 1). Vzorky byly při této opakované extrakci odebrány v časových intervalech 13, 14 a 15 hod. a v množství po 20 ml.

4.2 Stanovení sušiny sušením

Stanovení sušiny sušením bylo provedeno třikrát podle kapitoly 3.3. Z naměřených hodnot byl vypočítán průměr. Výsledky stanovení jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 9).

Tabulka 9: Stanovení sušiny plodů černého rybízu

Vzorek	Navážka [g]	Po vysušení [g]	Sušina [%]	Průměr [%]
1	12,5126	2,1675	17,3	17,3 ± 0,4
2	13,8555	2,3590	17,0	
3	8,2852	1,4622	17,7	

Obsah sušiny v plodech černého rybízu byl stanoven na 17,3 ± 0,4 %. Literatura udává obsah sušiny v plodech 17,0 % [32].

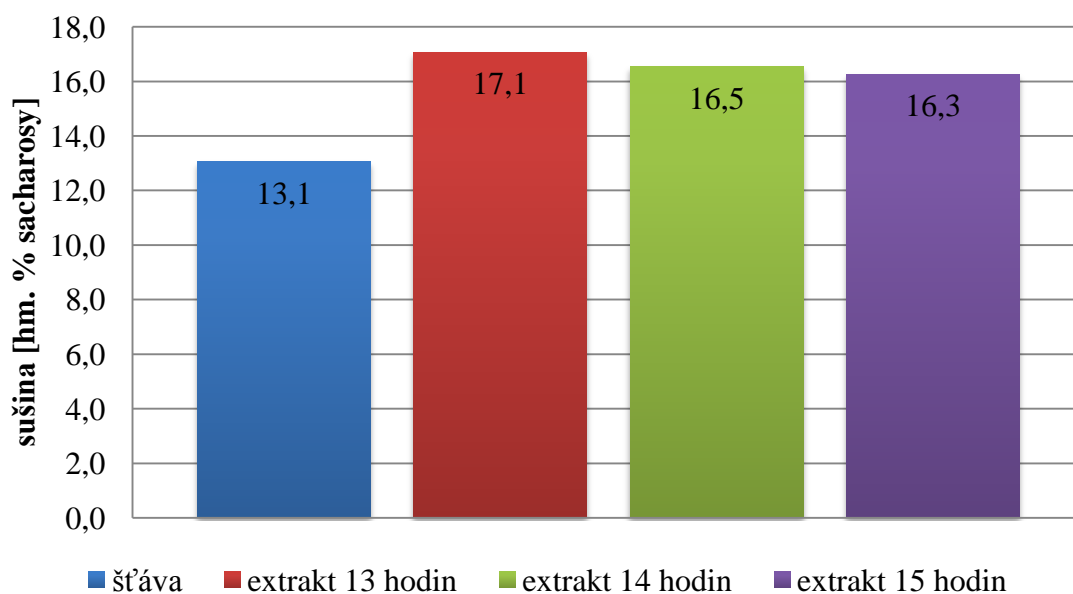
4.3 Refraktometrické stanovení rozpustné sušiny

Podle kapitoly 3.4 byla stanovena refraktometricky rozpustná sušina v rybízové šťávě a extraktu z výlisků černého rybízu. Extrahované vzorky pocházejí z opakované extrakce (viz kapitola 3.2.2) a byly odebírány pouze ve třech optimálních časech.

Pro každý vzorek byl na refraktometru odečten index lomu třikrát a v tabulkách byla nalezena příslušná hodnota rozpustné sušiny. Ze získaných hodnot byl vypočítán aritmetický průměr. Výsledné hodnoty jsou pro šťávu i extrakt uvedeny v tabulce (Tabulka 10) a porovnány v diagramu na obrázku (Obrázek 8).

Tabulka 10: Stanovení refraktometrické sušiny hm. % sacharosy

Vzorek	Index lomu	hm. % sacharosy	hm. % sacharosy po přepočtu
šťáva	1,3426	6,5	13,1
extrakt 13 hodin	1,3456	8,5	17,1
extrakt 14 hodin	1,3452	8,3	16,5
extrakt 15 hodin	1,3450	8,1	16,3



Obrázek 8: Porovnání obsahu rozpustné sušiny ve šťávě a v extraktech

Z grafického znázornění obsahu rozpustné sušiny ve vzorcích je patrné, že nejméně rozpustné sušiny obsahuje vzorek šťávy 13,1 hm. % sacharosy. Vzorky extraktů obsahují rozpustné sušiny více. Vzorek z extrakce 15 hodin 16,3 hm. % sacharosy, 14 hodin 16,54 hm. % sacharosy a vzorek z extrakce 13 hodin 17,1 hm. % sacharosy. U vzorků extraktů jsou hodnoty rozpustné sušiny vyšší než u šťávy. To je pravděpodobně způsobeno tím, že v extrakční směsi voda-ethanol bylo rozpuštěno více látek, které ovlivnily měřený index lomu.

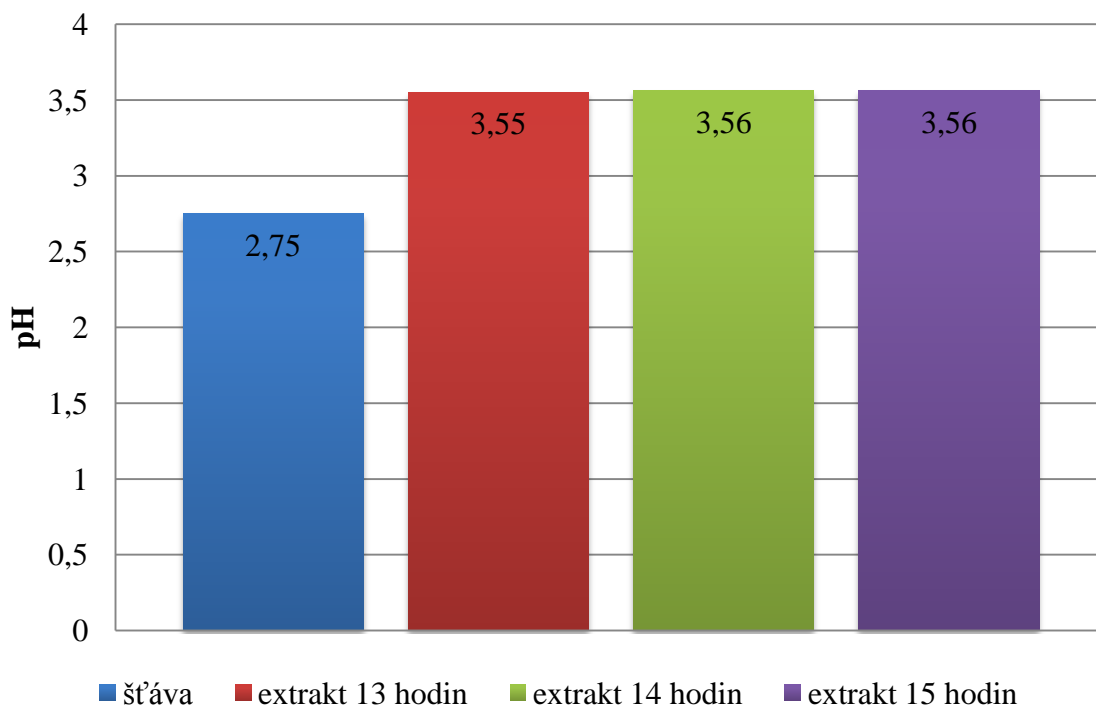
4.4 Stanovení pH

pH bylo stanoveno ve vzorku šťávy z černého rybízu a ve 3 extraktech z výlisků. Vzorky extraktů byly připraveny na základě výsledků uvedených v kapitole 4.1. Stanovení bylo pro každý vzorek provedeno třikrát, postup stanovení je uveden v kapitole 3.8. Výsledky měření jsou uvedeny jako aritmetický průměr.

Výsledné hodnoty pH vzorků jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 11) a srovnány v diagramu na obrázku (Obrázek 9).

Tabulka 11: Stanovení hodnoty pH

Vzorek	pH
šťáva	$2,75 \pm 0,02$
extrakt 13 hodin	$3,55 \pm 0,01$
extrakt 14 hodin	$3,56 \pm 0,00$
extrakt 15 hodin	$3,56 \pm 0,01$



Obrázek 9: Porovnání pH ve šťávě a v extraktech

Naměřené hodnoty pH se pohybovaly v rozsahu $2,75 \pm 0,02$ až $3,56 \pm 0,00$. Nejnižší hodnotu pH vykazovala šťáva z plodů černého rybízu a nejvyšší pH měly extrakty v čase 14 a 15 hodin.

4.5 Stanovení titrovatelných kyselin

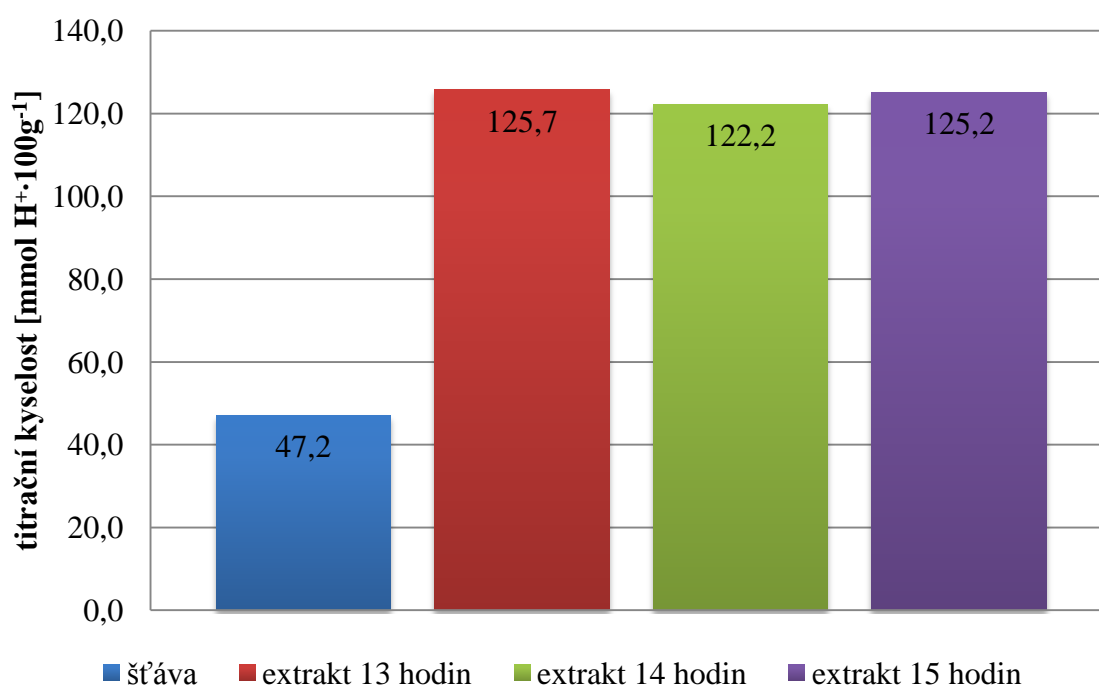
Stanovení titrační kyselosti bylo provedeno podle kapitoly 3.9. Byly analyzovány vzorky šťávy z černého rybízu a tři extrakty z výlisků. Vzorky extraktů byly připraveny

na základě výsledků uvedených v kapitole 4.1. Stanovení bylo provedeno pro každý vzorek třikrát a z výsledných hodnot byl vypočítán aritmetický průměr.

Výsledky měření jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 12) a srovnání titrační kyselosti pro šťávu a extrakty je zobrazeno v diagramu na obrázku (Obrázek 10).

Tabulka 12: Titrovatelné kyseliny ve šťávě a extraktech černého rybízu

Vzorek	Titrační kyselost [mmol H ⁺ ·100 g ⁻¹]
šťáva	47,2
extrakt 13 hodin	125,7
extrakt 14 hodin	122,2
extrakt 15 hodin	125,2



Obrázek 10: Porovnání výsledků titrační kyselosti šťávy a extraktů

Hodnoty jednotlivých stanovení titrační kyselosti extraktů jsou velmi podobné, na rozdíl od titrační kyselosti šťávy, která je podstatně nižší. Nejnižší naměřená hodnota titrační kyselosti byla u vzorku s nejnižším pH 2,75, což odpovídá vzorku šťávy, jejíž titrační kyselost byla stanovena na 47,2 mmol H⁺·100 g⁻¹. Titrační kyselost u extraktů se pohybuje v rozmezí 122,2 až 125,7 mmol H⁺·100 g⁻¹.

4.6 Stanovení anthokyanových barviv ve vybraných extraktech z výlisků

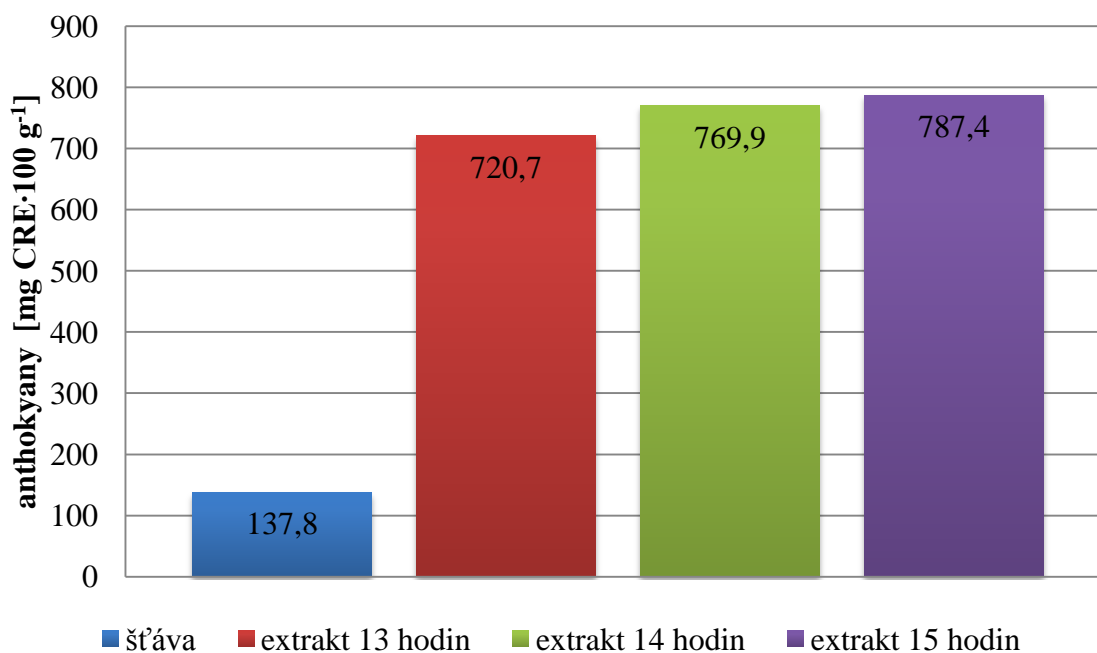
Obsah celkových anthokyanových barviv byl stanoven ve 3 vzorcích extraktů z výlisků černého rybízu a také ve šťávě z černého rybízu. Vzorky 3 extraktů pro toto stanovení byly připraveny podle nalezených výsledků uvedených v kapitole 4.1.

Celkové anthokyany byly stanoveny pH diferenciální metodou popsanou v kapitole 3.5. Jako ekvivalent monomerního pigmentu byla pro přepočet použita molekulová hmotnost kyanidin-3-rutinosidu (CRE), který je majoritním pigmentem černého rybízu.

Každý vzorek byl stanoven třikrát a z výsledných hodnot byla vypočítána průměrná hodnota, která byla vyjádřena v mg na 100 g suchých výlisků ($\text{mg CRE} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Hodnoty pro šťávu i extrakt jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 13) a vyneseny do grafu na obrázku (Obrázek 11).

Tabulka 13: Obsah anthokyanových barviv ve šťávě a extraktech z černého rybízu

Vzorek	Anthokyanová barviva [$\text{mg CRE} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
šťáva	137,8
extrakt 13 hodin	720,7
extrakt 14 hodin	769,9
extrakt 15 hodin	787,4



Obrázek 11: Srovnání obsahu anthokyanových barviv ve 100 g šťávy a ve 100 g výlisků černého rybízu

Z grafického znázornění obsahu anthokyanových barviv ve šťávě a v extraktech výlisků černého rybízu je patrné, že jejich koncentrace je ve šťávě mnohonásobně nižší než v extraktech. Ve 100 g šťávy z černého rybízu je 137,8 mg CRE, zatímco koncentrace vztahující se na 100 g výlisků černého rybízu se pohybuje v rozmezí 720,7 až 787,4 mg CRE. Výlisky je tedy možno považovat za dobrý zdroj anthokyanových barviv.

4.7 Stanovení fenolických látek

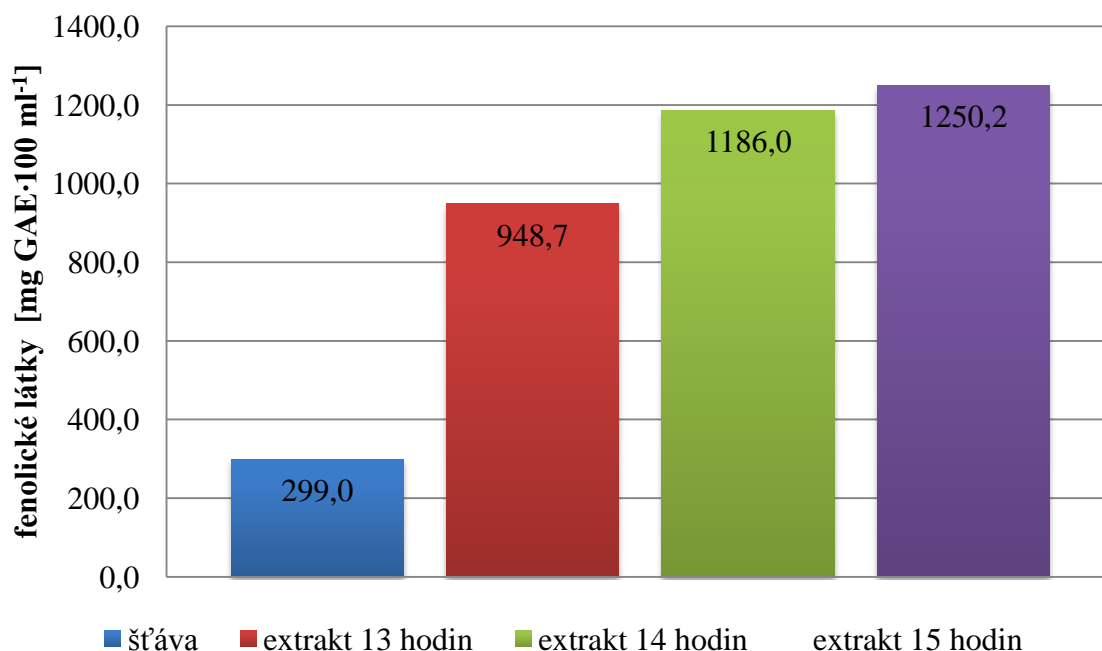
Obsah celkových fenolických látek byl stanoven ve vzorku šťávy černého rybízu a také ve třech vzorcích extraktů výlisků. Vzorky extraktů pro stanovení byly připraveny podle nalezených výsledků uvedených v kapitole 4.1. Celkové fenolické látky byly stanoveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.6. Pro přepočet celkových fenolů se na základě dohody používá kyselina gallová (GAE).

Podle standardů kyseliny gallové byla připravena kalibrační řada postupem v kapitole 3.6.2.3. Z naměřených hodnot byla sestavena kalibrační křivka (Obrázek 15). Ve studovaném rozsahu je tato závislost lineární, regresní koeficient je 0,999. Z regresní rovnice kalibrační křivky byl vypočítán celkový obsah fenolických látek ve vzorcích.

Výsledky měření celkových fenolických látek ve šťávě a v extraktech jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 14) jako ekvivalent kyseliny gallové v mg na 100 g suchých výlisků nebo šťávy. Výsledky jsou také porovnány v diagramu na obrázku (Obrázek 12).

Tabulka 14: Obsah fenolických látek ve šťávě a extraktech z černého rybízu

Vzorek	Fenolické látky [mg GAE·100 g ⁻¹]
šťáva	299,0
extrakt 13 hodin	948,7
extrakt 14 hodin	1186,0
extrakt 15 hodin	1250,2



Obrázek 12: Srovnání koncentrace fenolických látek ve šťávě černého rybízu a v extraktech z výlisků z černého rybízu

Z výsledných koncentrací fenolických látek ve vzorcích je patrné, že jejich koncentrace v extraktu z výlisků černého rybízu je mnohonásobně vyšší než koncentrace ve šťávě, přičemž se vzrůstajícím časem extrakce koncentrace fenolických látek v extraktu roste.

Obsah fenolických látek ve šťávě je 299,0 mg GAE·100 ml⁻¹ a v extrakce se koncentrace pohybuje v rozmezí 948,7 až 1250,2 mg GAE·100 ml⁻¹. Literatura udává obsah fenolických látek v plodech černého rybízu 227 až 789 mg GAE·100 g⁻¹ [13]. Výlisky lze tedy považovat za velice dobrý zdroj fenolických látek.

4.8 Obsah redukujících cukrů

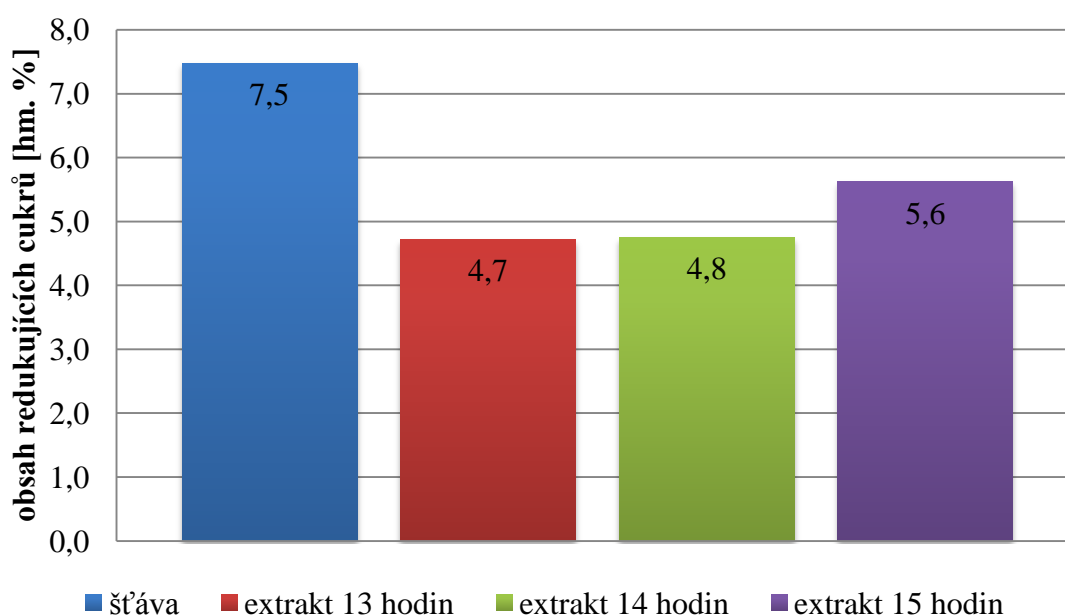
Obsah redukujících cukrů byl stanoven ve vzorku šťávy černého rybízu a také ve třech extraktech z výlisků. Vzorky extraktů pro toto stanovení byly připraveny podle nalezených výsledků uvedených v kapitole 4.1.

Pro každý vzorek bylo provedeno dvakrát stanovení redukujících cukrů gravimetrickou metodou podle kapitoly 3.7.3.2 a jednou metodou podle Bertranda podle kapitoly 3.7.3.1. Výsledné procentuální množství redukujících cukrů pro každý vzorek je uvedeno jako aritmetický průměr všech tří stanovení.

Výsledky jednotlivých stanovení a spočítané aritmetické průměry jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 15), Obsah redukujících cukrů ve šťávě a v extraktech je porovnán v diagramu na obrázku (Obrázek 13).

Tabulka 15: Stanovení redukujících cukrů ve šťávě a v extraktech černého rybízu

Stanovení	šťáva [hm. %]	extrakt 13 hodin [hm. %]	extrakt 14 hodin [hm. %]	extrakt 15 hodin [hm. %]
gravimetrie	7,5	4,7	4,7	5,6
gravimetrie	7,1	4,7	4,4	5,5
dle Bertranda	7,9	4,8	5,1	5,8
Průměr	7,5	4,7	4,8	5,6



Obrázek 13: Srovnání obsahu redukujících cukrů ve šťávě a v extraktech černého rybízu

Obsah redukujících cukrů byl stanoven gravimetrickou metodou a metodou podle Bertranda. Z grafu je patrné, že největší obsah redukujících cukrů 7,5 hm. % má šťáva z plodů černého rybízu. Množství redukujících cukrů v extraktech se pohybuje v rozmezí 4,7 až 5,6 hm. % s tím, že s rostoucím časem extrakce množství redukujících cukrů vzrůstá. Extrakty obsahovaly nižší množství redukujících cukrů, což je zřejmě způsobeno tím, že redukující cukry jsou v ethanolu méně rozpustné.

4.9 Stanovení vitaminu C

Vitamin C byl stanoven ve vzorku šťávy a ve třech extraktech z výlisků černého rybízu. Vzorky extraktů byly připraveny na základě výsledků uvedených v kapitole 4.1.

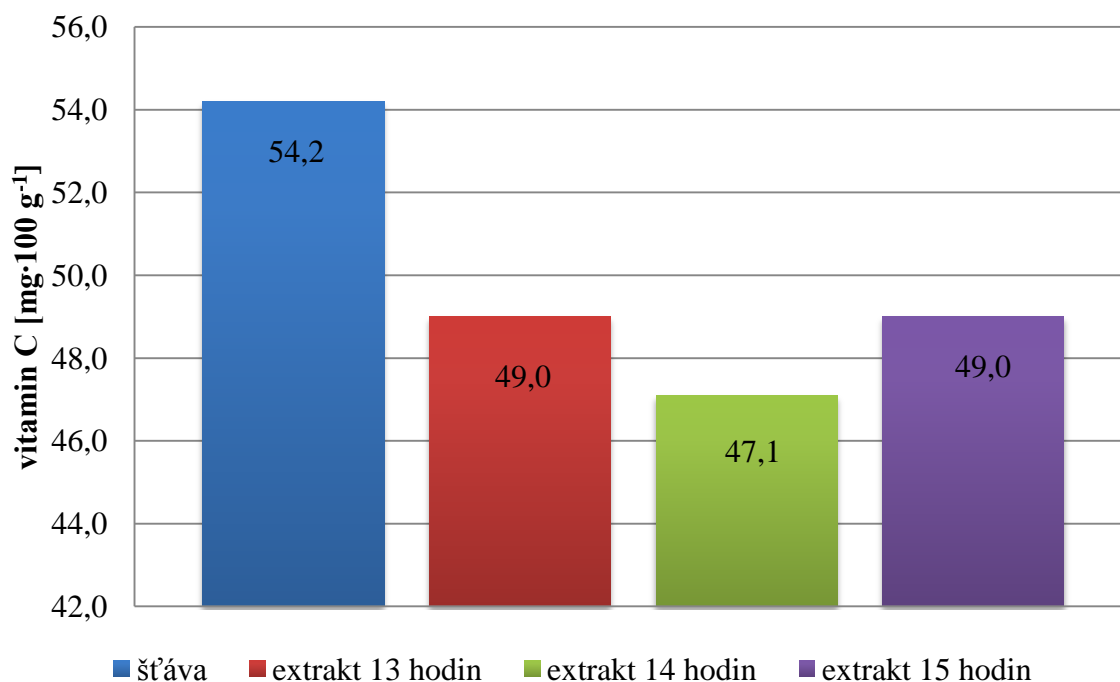
Kalibrační řada byla připravena podle postupu v kapitole 3.10.2.6 a z naměřených hodnot byla sestavna kalibrační křivka (Obrázek 16). Tato závislost je ve studovaném rozsahu lineární, regresní koeficient je 0,996.

Postup stanovení vitaminu C je uveden v kapitole 3.10.3. Stanovení bylo pro každý vzorek provedeno třikrát. Z regresní křivky byl počítán přebytek barviva podle postupu v kapitole 3.10.4. Výsledné hodnoty obsahu vitaminu C byly vypočteny jako aritmetický průměr ze tří měření.

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 16) a srovnání obsahu vitaminu C ve šťávě a extraktech je zobrazeno v diagramu na obrázku (Obrázek 14).

Tabulka 16: Obsah vitaminu C ve 100 g šťávy a 100 g výlisků černého rybízu

Vzorek	Vitamin C [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
šťáva	54,2
extrakt 13 hodin	49,0
extrakt 14 hodin	45,8
extrakt 15 hodin	49,0



Obrázek 14: Grafické srovnání obsahu vitamínu C ve šťávě a v extraktech

Nejvyšší koncentrace vitamínu C byla stanovena ve šťávě z plodů černého rybízů $54,2 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. V extraktech z výlisků byl obsah vitamínu C stanoven v rozmezí $47,1$ až $49,0 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Tato množství vitamínu C jsou proti obsahu udávanému v literatuře ($166,0 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) značně odlišné [11]. Pokles obsah vitamínu C ve studovaných vzorcích se dá přičítat delšímu skladování šťáv a extraktů v mrazničce a jejich rozmrazování a opětovné zamrazování. U extraktů se dá pokles vitamínu ještě přičítat několikahodinovému sušení výlisků a jejich delšímu skladování.

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla extrakce biologicky aktivních látek z výlisků černého rybízu.

Výchozím předpokladem bylo, že způsob extrakce, tedy především výběr rozpouštědla a délka extrakce, mají zásadní vliv na množství výtěžku. V experimentu byly provedeny extrakce vodou za laboratorní teploty a extrakce směsí voda-ethanol v poměru 1 : 1 za laboratorní teploty.

Při extrakci výlisků vodou o laboratorní teplotě byly výtěžky barviv podstatně nižší než při extrakci směsí voda-ethanol při téže teplotě. Nejvyššího výtěžku anthokyanů, tj. 769,9 mg CRE ve 100 g suchých výlisků, bylo dosaženo při použití extrakčního činidla voda-ethanol (1 : 1). Doba extrakce, dostačující pro maximální výtěžek anthokyanů byla 14 hodin.

Pro stanovení vybraných charakteristik extraktu byly výlisky extrahovány ještě jednou za použití ověřeného lepšího extrakčního činidla (voda:ethanol v objemovém poměru 1 : 1). Vzorky byly při této opakované extrakci odebrány v časových intervalech 13, 14 a 15 hod. v množství po 20 ml.

Chemické a fyzikální charakteristiky extraktů z výlisků černého rybízu byly tedy zjišťovány u třech vzorků. Pro srovnání byla ještě analyzována rybízová šťáva.

Sušina byla v plodech černého rybízu stanovena sušením. Tvořila $17,1 \pm 0,4$ hmotnostních % z váhy mražených bobulí.

Rozpustná sušina v extraktech byla 16,3 až 17,1 hm. %. Šťáva černého rybízu obsahovala 13,1 hm. % s rozpustné sušiny.

Hodnota pH u extraktů byla velice podobná $3,55 \pm 0,01$ až $3,56 \pm 0,00$. Hodnota pH šťávy byla nižší $2,75 \pm 0,02$.

Nejnižší hodnota titrační kyselosti byla zjištěna u šťávy a to $47,2 \text{ mmol H}^+ \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Titrační kyselost extraktů byla téměř vyrovnaná a vyšší než u šťávy $122,2$ až $125,7 \text{ mmol H}^+ \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

Z naměřených dat je patrné, že obsah antokyanových barviv ve šťávě je podstatně nižší než obsah těchto barviv v extraktech z výlisků. 100 g šťávy obsahovalo 137,8 mg CRE, oproti tomu extrakty z výlisků plodů obsahovaly 720,7 až 787,4 mg CRE $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Z výsledků vyplývá, že výlisky obsahují větší množství barviv než šťáva.

Obsah celkových fenolických látek ve šťávě je stejně jako obsah antokyanových barviv podstatně nižší. 100 g šťávy obsahovalo 299,0 mg GAE, oproti tomu 100 g suché váhy výlisků černého rybízu obsahovalo 948,7 až 1250,2 mg GAE. Stejně jako u anthokyanů z výsledků vyplývá, že výlisky obsahují daleko více fenolických látek než šťáva.

Větší množství redukujících cukrů se nacházelo ve šťávě a to 7,5 hm. %. Extrakty obsahovaly 4,7 až 5,6 hm. % redukujících cukrů, jejich nižší množství je nejspíše způsobeno tím, že jsou redukující cukry v ethanolu méně rozpustné.

Posledním sledovaným parametrem byl obsah vitamínu C. Jeho obsah byl ve šťávě $54,2 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ a v extraktech se jeho koncentrace pohybovala v rozmezí 47,1 až $49,0 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Tyto hodnoty jsou na rozdíl od hodnot uváděných v literatuře ($166,0 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) daleko nižší [11]. Což je pravděpodobně způsobeno delším skladováním vzorků, jejich rozmrazování a opětovné zmrazování. U výlisků lze nízký obsah vitamínu C přičítat také několikahodinovému sušení výlisků a jejich následné skladování.

Získané výsledky dokazují, že výlisky černého rybízu jsou dobrým zdrojem cenných fenolických látek a antokyanových barviv, které by z výlisků bylo možné získávat. Obsah těchto látek je podstatně vyšší v extraktech než ve šťávě.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HRIČOVSKÝ, Ivan. Rybíz, angrešt na zahrádce. 2. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1990. Rostlinná výroba (Státní zemědělské nakladatelství). ISBN 80-209-0097-7
- [2] Welcome to the PLANTS Database: USDA PLANTS [online]. Last revision 2009 [cit. 2017-01-05]. Classification. Dostupné z: <http://plants.usda.gov/java/>
- [3] HARANT, Miloš a Vladimír ZACHA. Pěstujeme bobuloviny. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1974. Rostlinná výroba (Státní zemědělské nakladatelství). ISBN 07-059-74.
- [4] RICHTER, Miloslav. Velký atlas odrůd ovoce a révy. Lanškroun: TG TISK, c2002. ISBN 80-238-9461-7.
- [5] Elektronický Herbář [online]. Poslední revize 11. 09. 2010 [cit. 2017-01-05]. Dostupné z: http://www.e-herbar.net/main.php?g2_itemId=11097
- [6] HRIČOVSKÝ, Ivan. Technológia pestovania ríbezlí. Bratislava: Príroda, 1982. Edícia Ministerstva poľnohospodárstva a výživy Slovenskej socialistickej republiky. ISBN 64-259-82.
- [7] Health and Eating–Food [online]. Useful ingredients of blackcurrant [cit. 2017-01-05]. Dostupné z: <http://healtheatingfood.com/useful-ingredients-of-blackcurrant/>
- [8] Drobné ovoce a skořápkoviny: přes 140 barevných fotografií a popisů odrůd. Olomouc: Baštan, 2013, ISBN 978-80-87091-40-1.
- [9] Zahradnictví Zoja [online]. Rybízy [cit. 2017-01-05]. Dostupné z: <https://www.zzoja.cz/katalog/rybizy/kerovy>
- [10] BLAŽEK, Jan. Ovocnictví. 2. nezm. vyd. Praha: Květ, 2001. ISBN 80-853-6243-0.
- [11] Databáze složení potravin ČR verze 4.13: Ústav zemědělské ekonomiky a informací a Výzkumný ústav potravinářský. Nutridatabaze.cz: Databáze složení potravin pro Českou republiku [online]. Praha, 2013 [cit. 2017-01-05]. Dostupné z: <http://www.nutridatabaze.cz/>
- [12] VARMING, Camilla, Mikael A. PETERSEN a Leif POLL. Comparison of Isolation Methods for the Determination of Important Aroma Compounds in Black Currant (Ribes nigrum L.) Juice, Using Nasal Impact Frequency Profiling. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2004, 52(6), 1647-1652 [cit. 2017-01-05]. DOI: 10.1021/jf035133t. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf035133t>
- [13] OCHMIAN, I., A. DOBROWOLSKA a P. CHEŁPIŃSKI. Physical Parameters and Chemical Composition of Fourteen Blackcurrant Cultivars (Ribes nigrum

- L.). *Notulae botanicae Horti agrobotanici Cluj-Napoca*. 2014, roč. 42, č. 1, s. 160-167 [cit. 2017-01-05]. Dostupné z: <http://www.notulaebotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/9103>
- [14] SANDELL, Mari, Oskar LAAKSONEN, Riikka JÄRVINEN, Nina ROSTIALA, Terhi POHJANHEIMO, Katja TIITINEN a Heikki KALLIO. Orosensory Profiles and Chemical Composition of Black Currant (*Ribes nigrum*) Juice and Fractions of Press Residue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, **57**(9), 3718-3728. DOI: 10.1021/jf803884y. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf803884y>
- [15] MATĚJČEK, Aleš. Inovativní pěstování angreštu a rybízu se zaměřením na produkci stolních plodů, technologii a nutriční benefity: metodika. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy, 2015. ISBN 978-80-87030-36-3.
- [16] BAKOWSKA-BARCZAK, Anna M., Andreas SCHIEBER a Paul KOLODZIEJCZYK. Characterization of Canadian Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Seed Oils and Residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, **57**(24), 11528-11536. DOI: 10.1021/jf902161k. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf902161k>
- [17] DVARANAUSKAITE, Asta, Petras R. VENSKUTONIS, Christine RAYNAUD, Thierry TALOU, Pranas VIŠKELIS a Edita DAMBRAUSKIENE. Characterization of Steam Volatiles in the Essential Oil of Black Currant Buds and the Antioxidant Properties of Different Bud Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, **56**(9), 3279-3286. DOI: 10.1021/jf7037168. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf7037168>
- [18] HELENO, Sandrina A., Anabela MARTINS, Maria João R.P. QUEIROZ a Isabel C.F.R. FERREIRA. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds. *Food Chemistry*. 2015, **173**, 501-513. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.057. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614016197>
- [19] ZADERNOWSKI, Ryszard, Marian NACZK a Jarosław NESTEROWICZ. Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, **53**(6), 2118-2124. DOI: 10.1021/jf040411p. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf040411p>
- [20] MANGANARIS, George A, Vlasios GOULAS, Ariel R VICENTE a Leon A TERRY. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014, **94**(5), 825-833. DOI: 10.1002/jsfa.6432. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.6432>
- [21] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902-3915-3.

- [22] STRATIL, P., B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*. 2007, **71**(4), 1741-1751. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.08.012. ISSN 00399140. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914006005741>
- [23] A AGBOR, Gabriel, Joe A VINSON a Patrick E. DONNELLY. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*. 2014, , 147-156. DOI: 10.19070/2326-3350-1400028. ISSN 23263350. Dostupné také z: <http://scidoc.org/articlepdfs/IJFS/IJFS-2326-3350-03-801.pdf>
- [24] STRATIL, Pavel, Bořivoj KLEJDUS a Vlastimil KUBÁŇ. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables Evaluation of Spectrophotometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, **54**(3), 607-616. DOI: 10.1021/jf052334j. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf052334j>
- [25] SINGLETON, V. L., R. ORTHOFER a R. M. LAMUELA-RAVENTÓS. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* [online]. 1999, vol. 299, s. 152-178 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687999990171>
- [26] STRATIL, P., V. KUBÁŇ a J. FOJTOVA. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. Czech Journal of Food Sciences, 2008, roč. 26, č. 4, s. 242-253 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/01961.pdf>
- [27] ETTINGER, M, C RUCHHOFT a R LISHKA. Sensitive 4-Aminoantipyrine Method for Phenolic Compounds. *Analytical Chemistry*. 1951, **23**(12), 1783-1788. DOI: 10.1021/ac60060a019. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60060a019>
- [28] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [29] HASAL, Pavel, Igor SCHREIBER a Dalimil ŠNITA. *Chemické inženýrství I*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2007. ISBN 978-80-7080-002-7.
- [30] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Procesy a zařízení v potravinářství a biotechnologiích*. Ostrava: Key Publishing, 2013. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-163-4.
- [31] LOŠKOVÁ, T. Studium extrakce biologicky aktivních látek z bezových výlisků. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 55 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

- [32] SANDELL, Mari, Oskar LAAKSONEN, Riikka JÄRVINEN, Nina ROSTIALA, Terhi POHJANHEIMO, Katja TIITINEN a Heikki KALLIO. Orosensory Profiles and Chemical Composition of Black Currant (*Ribes nigrum*) Juice and Fractions of Press Residue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2009, **57**(9), 3718-3728 [cit. 2017-05-24]. DOI: 10.1021/jf803884y. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf803884y>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

RE	ekvivalent retinolu
ATE	ekvivalent alfa-tokoferolu
FCH	Fakulta chemická
UV	ultrafialové záření
VUT	Vysoké učení technické
VIS	viditelné záření
CRE	ekvivalent kysnidin-3-rutinosidu
GAE	ekvivalent kyseliny gallové

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Tabulky – stanovení antokyanových barviv	57
Příloha 2: Tabulka – stanovení antokyanových barviv ve šťávě a v extraktech	58
Příloha 3: Tabulka – stanovení fenolických látek ve šťávě a v extraktech	58
Příloha 4: Kalibrační křivka kyseliny gallové.....	59
Příloha 5: Tabulka – stanovení titrovatelných kyselin ve šťávě a v extraktech	59
Příloha 6: Tabulka – stanovení vitamínu C ve šťávě a v extraktech.....	60
Příloha 7: Kalibrační závislost absorbance jako funkce objemu k objemu roztoku přidávaného barviva.....	60

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Tabulky – stanovení antokyanových barviv

Tabulka 17: Průměrné hodnoty absorbance ze tří měření pro extrakci výlisků vodou

voda (laboratorní teplota)					
doba extrakce [hod]	A510		A700		ředění
	pH 4,5	pH 1	pH 4,5	pH 1	
1	0,028	0,224	0,002	0,000	11x
2	0,035	0,295	0,004	0,002	
3	0,042	0,320	0,004	0,002	
4	0,041	0,335	0,003	0,003	
5	0,042	0,349	0,005	0,002	
6	0,050	0,386	0,007	0,004	
7	0,039	0,224	0,001	0,002	
8	0,048	0,413	0,001	0,001	
9	0,044	0,396	0,002	0,000	
10	0,056	0,430	0,001	0,000	
11	0,049	0,420	0,000	0,000	
12	0,057	0,462	0,001	0,001	
13	0,056	0,461	0,002	0,000	
14	0,052	0,451	0,000	0,000	

Tabulka 18: Průměrné hodnoty absorbance ze tří měření pro extrakci směsi voda/ethanol 1:1

voda/ethanol 1:1 (laboratorní teplota)					
doba extrakce [hod]	A510		A700		ředění
	pH 4,5	pH 1	pH 4,5	pH 1	
1	0,015	0,156	0,000	0,000	20x
2	0,028	0,272	0,001	0,000	
3	0,031	0,317	0,000	0,001	
4	0,037	0,366	0,001	0,00	
5	0,040	0,391	0,001	0,001	
6	0,037	0,392	0,002	0,003	25x
7	0,033	0,331	0,003	0,003	
8	0,035	0,357	0,003	0,002	
9	0,036	0,345	0,003	0,001	
10	0,035	0,357	0,002	0,002	
11	0,034	0,370	0,002	0,001	
12	0,033	0,347	0,002	0,002	
13	0,040	0,390	0,002	0,002	
14	0,038	0,412	0,002	0,002	

Příloha 2: Tabulka – stanovení antokyanových barviv ve šťávě a v extraktech

Tabulka 19: Průměrné hodnoty absorbance ze tří měření pro šťávu a extrakty

vzorek	A510		A700		ředění
	pH 4,5	pH 1	pH 4,5	pH 1	
šťáva	0,002	0,069	0,000	0,000	100x
extrakt 13 hodin	0,040	0,390	0,002	0,002	25x
extrakt 14 hodin	0,038	0,412	0,002	0,002	
extrakt 15 hodin	0,037	0,418	0,002	0,002	

Příloha 3: Tabulka – stanovení fenolických látek ve šťávě a v extraktech

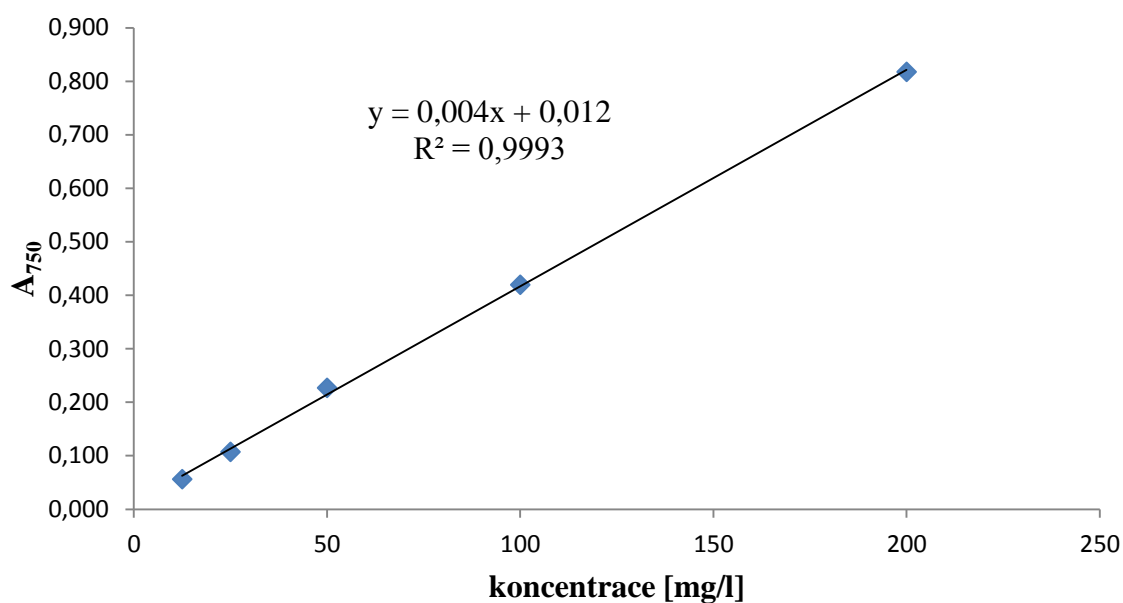
Tabulka 20: Průměrné hodnoty absorbance ze tří měření pro šťávu a extrakty

vzorek	A ₇₅₀	ředění
šťáva	0,133	100x
extrakt 13 hodin	0,108	
extrakt 14 hodin	0,132	
extrakt 15 hodin	0,139	

Příloha 4: Kalibrační křivka kyseliny gallové

Tabulka 21: Průměrné hodnoty absorbance ze tří měření pro sestavení kalibrační křivky kyseliny gallové

Koncentrace kyseliny gallové [mg·l ⁻¹]	A ₇₅₀
12,5	0,056
25	0,107
50	0,227
100	0,420
200	0,818



Obrázek 15: Kalibrační křivka kyseliny gallové

Příloha 5: Tabulka – stanovení titrovatelných kyselin ve šťávě a v extraktech

Tabulka 22: Průměrná spotřeba NaOH při titraci vzorků šťávy a nejlepších extraktů

vzorek	spotřeba NaOH [ml]
šťáva	45,3
extrakt 13 hodin	2,1
extrakt 14 hodin	2,2
extrakt 15 hodin	2,2

Příloha 6: Tabulka – stanovení vitamínu C ve šťávě a v extraktech

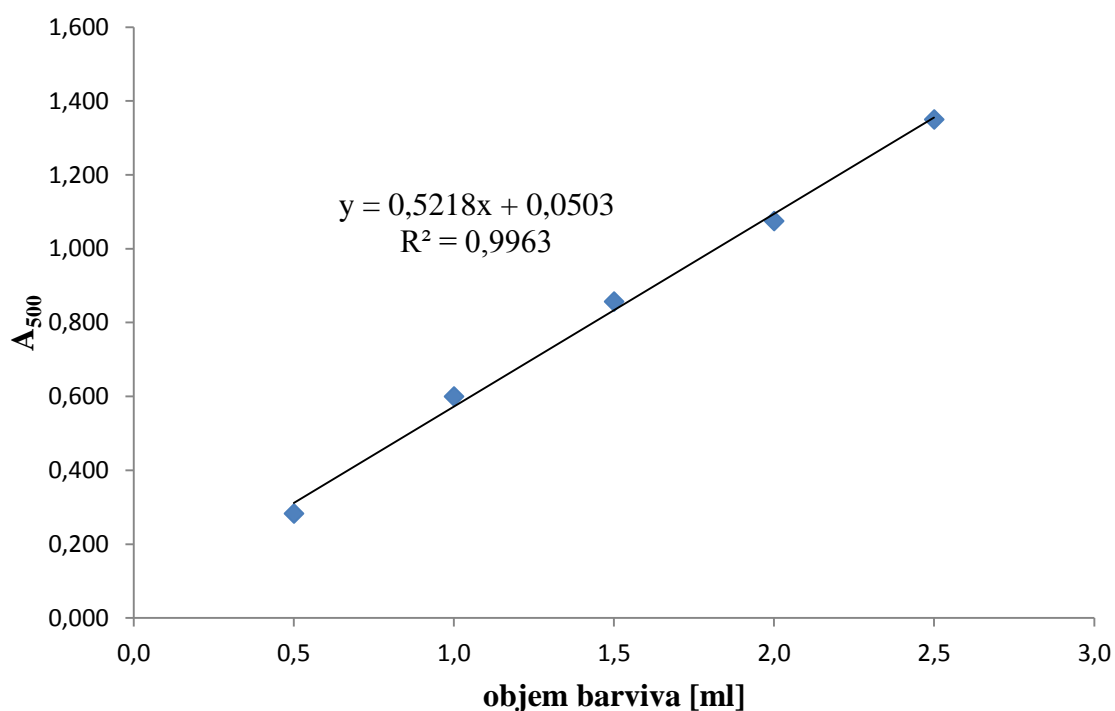
Tabulka 23: Průměrná hodnota absorbance ze tří měření, množství nezredukovaného barviva

vzorek	přidané barvivo[ml]	A ₅₀₀	nezredukované barvivo [ml]
šťáva	4,0	0,504	0,869
extrakt 13 hodin	3,0	0,881	1,592
extrakt 14 hodin	3,0	0,909	1,646
extrakt 15 hodin	3,0	0,880	1,590

Příloha 7: Kalibrační závislost absorbance jako funkce objemu k objemu roztoku přidávaného barviva

Tabulka 24: Průměrné hodnoty absorbance ze tří měření pro sestavení kalibrační křivky

objem barviva [ml]	A ₅₀₀
0,5	0,283
1,0	0,600
1,5	0,857
2,0	1,075
2,5	1,350



Obrázek 16: Kalibrační závislost absorbance na objemu barviva